

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Immunologie
Leiter: Prof. Dr. D. Gemsa

**Freisetzung von
Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) und
Chemokinen aus Influenza A Virus-infizierten
Lungenepithelzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Theoretische Medizin)

Dr. rer. physiol.

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ute Arndt, geb. Halbach

aus Locarno

Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 31.05.2000

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. H.F. Kern
Referent:	Prof. Dr. D. Gemsa
Koreferent:	Prof. Dr. B. Steiniger

Für Michael

C'est les microbes qui auront le dernier mot...

Louis Pasteur

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Influenza Viren	1
1.1.1.	Taxonomie	1
1.1.2.	Struktur und Charakterisierung von Influenza A-Viren	2
1.1.3.	Funktion der viralen Proteine	2
1.1.3.1.	Nukleoproteine	2
1.1.3.2.	Hüllproteine	3
1.1.3.3.	Nicht-glykolytierte Proteine	4
1.1.3.4.	Nicht-Strukturproteine	4
1.1.4.	Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren	5
1.1.5.	Antigendrift und Antigen shift	6
1.1.6.	Pathogenese und Klinik der Erkrankung	7
1.1.7.	Reaktionen des Immunsystems gegenüber Influenza A-Viren	8
1.2.	Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF)	9
1.2.1.	Charakterisierung von MIF	9
1.2.2.	Struktur des MIF	12
1.2.3.	Die Rolle des MIF bei Erkrankungen	13
1.3.	Chemokine	15
1.3.1.	Struktur und Funktion der Chemokine	15

1.3.2.	Chemokinproduzierende Zellen	20
1.3.3.	Chemokine vermitteln Leukozytenwanderung und -aktivierung	20
1.3.4.	Chemokinrezeptoren	22
1.3.4.1.	CXC-Chemokinrezeptoren	22
1.3.4.2.	CC-Chemokinrezeptoren	23
1.4.	Zielsetzung	25
2.	Material und Methoden	26
2.1.	Medien, Zellkulturen und Virusstamm	26
2.1.1.	Medien	26
2.1.2.	Zellen	26
2.1.2.1.	Bronchioläre Zelllinie U1752	26
2.1.2.2.	Alveoläre Zelllinie A549	27
2.1.2.3.	Primäre humane Bronchialepithelzellen (normal human bronchiolar epithelial cells. NHBE)	27
2.1.2.4.	Zellen in Bioassays	27
2.1.3.	Testsysteme in der Zellkultivierung	28
2.1.3.1.	Überprüfung der Zellkulturen auf Mycoplasmen	28
2.1.3.2.	LAL-Test (limulus amoebocyte lysate test) zum Nachweis von Endotoxin	29
2.1.4.	Virusstamm	29

2.2.	Methoden	29
2.2.1.	Infektion der Lungenepithelzellen	29
2.2.1.1.	Gewinnung von Zellüberständen	30
2.2.1.2.	Gewinnung von Zellysaten	30
2.2.2.	Vermehrung und Reinigung von Influenza A Viren	31
2.2.2.1.	Vorbereitung der Eier und Beimpfung	31
2.2.2.2.	Ernte der Allantoisflüssigkeit	32
2.2.2.3.	Reinigung	32
2.2.2.4.	Dialyse und Lagerung	33
2.2.3.	Hämagglutinationstest (HA-Test)	33
2.2.4.	Plaque-Test	34
2.2.5.	Inaktivierung von Influenza A-Viren	35
2.2.5.1.	UV-Inaktivierung	35
2.2.5.2.	Inaktivierung bei 56°C	35
2.2.5.3.	Inaktivierung bei 100°C	36
2.2.6.	Konzentrierung der Zellüberstände	36
2.2.7.	Westernblot	36
2.2.8.	MTT-Färbung	37
2.2.9.	LDH-Nachweis	38
2.2.10.	Nachweis von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch die Annexin V-Methode	38
2.2.11.	Nachweis von DNA-Leitern in apoptotischen Zellen	39
2.2.12.	Messung des durch MIF ausgelösten Ca-Einstroms in Stromazellen der Ratte	39
2.2.13.	ELISA-Technik (Enzyme linked immunosorbent assay)	40
2.2.13.1.	MIF-ELISA	41
2.2.13.2.	IL-8-ELISA	41
2.2.13.3.	GRO- α -ELISA	42
2.2.13.4.	MCP-1-ELISA	42
2.2.13.5.	MIP-1 α -ELISA	43
2.2.13.6.	RANTES-ELISA	43

2.2.13.7.	IL-1 β -ELISA	44
2.2.13.8.	IL-6-ELISA	44
2.2.13.9.	IL-10-ELISA	44
2.2.13.10.	TNF- α -ELISA	45
2.2.13.11.	IFN α - und IFN- β -ELISA	45
2.2.14.	Immunhistochemie	46
2.2.14.1	MIF-Darstellung, ABC-Methode	46
2.2.14.2	Immunhistochemischer Nachweis von regulatorischen Proteinen in der Apoptose (bcl-2, bcl-X _L , bcl-X _S)	47
2.2.15.	Darstellung von MIF mittels Immunfluoreszenzfärbung	48
2.2.16.	RNA-Isolierung	49
2.2.17.	cDNA-Synthese	50
2.2.18.	Amplifizierung von DNA durch PCR	50
2.2.18.1.	Primerauswahl	51
2.2.18.2.	Amplifizierungsreaktion	53
2.2.18.3.	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	54
2.2.19.	Northern Blot	55
2.2.19.1.	Präparation von RNA	55
2.2.19.2.	Agarose-Gelelektrophorese für RNA	55
2.2.19.3.	Blotting	57
2.2.19.4.	Nicht-radioaktive Hybridisierung	58
2.2.19.5.	Detektion der hybridisierten RNA	59
2.2.20.	Calcium-Influx-Assay	61
2.2.21.	Immunpräzipitation	62

3.	Ergebnisse	63
3.1.	Morphologie der Lungenepithelzellen nach Influenza A-Virusinfektion	63
3.2.	Vitalität der Zellen nach Influenza A- Virusinfektion	65
3.3.	Replikation von Influenza A-Viren in humanen Lungenepithelzellen	67
3.3.1	Nachweis von viraler mRNA	67
3.3.2.	Freisetzung infektiöser Viruspartikel	69
3.4.	Mechanismus des Zelltodes in Lungenepithelzellen	71
3.5.	Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) in Lungenepithelzellen	76
3.5.1.	Bronchioläre Epithelzellen exprimieren konstitutiv MIF	76
3.5.2.	MIF wird aus Influenza A-virusinfizierten Lungen- epithelien freigesetzt	77
3.5.3.	Aus Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen wird bioaktiver MIF freigesetzt	84
3.5.4.	Einfluß von inaktivierten Influenza A-Viren auf die MIF-Freisetzung aus alveolärem und bronchiolärem Epithel	88
3.5.5.	Nachweis der MIF-mRNA in alveolären und bronchiolären Epithelzellen	89
3.5.5.1.	Nachweis der konstitutiven Expression von MIF-mRNA über die Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	89

3.5.5.2.	MIF-mRNA-Expression in A/PR/8/34-infizierten Lungenepithelzellen : Nachweis im Westernblot	90
3.5.5.3.	Nachweis der MIF-mRNA-Expression in Zelllinien und primären humanen Bronchialepithelien nach Infektion mit A/PR/8/34 mittels RT-PCR	91
3.6.	Induktion von Chemokinen in Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen	93
3.6.1.	CXC-Chemokine: Nachweis der Proteine	93
3.6.1.1.	Interleukin-8	93
3.6.1.2.	GRO- α	95
3.6.2.	CC-Chemokine: Nachweis der Proteine	97
3.6.2.1.	RANTES	97
3.6.2.2.	MCP-1	98
3.6.2.3.	MIP-1 α	100
3.6.3.	Darstellung der Chemokin m-RNA in A549-, U1752-Zellen und in primären Bronchialepithelzellen mittels RT-PCR	100
3.7.	Sekretion der Zytokine TNF-α, IL-6, IL-1β und IL-10 aus Influenza A-virusinfiziertem Lungenepithel	103
3.8.	Vorbehandlung der Lungenepithelzellen mit TNF-α und mit Interleukin-1β	103
3.8.1.	Vorbehandlung mit TNF-α induziert Chemokinsekretion	104
3.8.2.	Vorbehandlung mit IL-1β führt in Lungenepithelzellen zur Induktion von MxA-Proteinen und zur Freisetzung von Chemokinen	107
3.8.2.1.	IL-1 β schützt die Zellen vor Influenza A-Virusinfektion	107

3.8.2.2.	Induziert IL-1 β Interferon α/β oder Mx-Proteine	109
3.8.2.2.1.	Interferon α/β	109
3.8.2.2.2.	MxA-Induktion	110
3.8.2.3.	Einfluß einer IL-1 β -Vorbehandlung auf die Freisetzung von MIF	111
3.8.2.4.	Chemokininduktion in Lungenepithelzellen nach IL-1 β -Behandlung	113
4.	Diskussion	119
4.1.	Nekrose oder Apoptose?	119
4.2.	Freisetzung von Mediatoren der Inflammation	121
4.2.1.	Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF)	122
4.2.2.	Chemokine	126
4.3.	Vorinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen: IL-1β und TNF-α	130
4.3.1.	Stimulation mit TNF-α	130
4.3.1.1.	Einfluß auf Chemokine und MIF	130
4.3.1.2.	Zeigt TNF- α antivirale Wirkung	131
4.3.2.	Stimulation mit IL-1β	131
4.3.2.1.	Einfluß auf Chemokine und MIF	131
4.3.2.2.	Hat IL-1 β antivirale Wirkung? Interferone und MxA-Protein	132
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturangaben	137

Abkürzungsverzeichnis

A549	alveoläre Zelllinie
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
A.dest.	entionisiertes Wasser
A/PR/8/34	Influenza A-Virus A/PR/8/34
bcl	B-cell-lymphoma
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementäre DNA
CPE	cytopatischer Effekt
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CXCR	CXC- Chemokinrezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyrobonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRO	growth related oncogene
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethanesulfonic acid
HBSS	HANKS balanced salt solution
IFN- α/β	Interferon- α/β
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin-
kD	Kilodalton

LAL	Limulus amoebocyte lysate
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP	monocyte chemoattractant protein
MDCK	Madin Darby canine kidney
MIF	Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein- α
MOI	multiplicity of infection
MTT	3-(dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NA	Neuraminidase
NHBE	normale humane Bronchialepithelzellen
NP	Nukleoprotein
OD	optische Dichte
OPD	o-phenyldiamin-dihydrochlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS ⁺⁺	phosphate buffered saline, mit Ca- und Mg-Ionen
PBS ^{def}	phosphate buffered saline, ohne Ca und Mg
PFU	plaque forming units
p.i.	post infectionem
r	rekombinant
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	RPMI-Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
rh	rekombinant human
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfat
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TUNEL	terminal dUTP nick end labeling
U	Unit

U1752	bronchioläre Zelllinie
UV	ultraviolett
V	Volt
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
ZT	Zimmertemperatur

1. Einleitung

1.1. Influenza A-Viren

Bereits in der Antike wurden grippeähnliche Epidemien beschrieben, die man heute den Influenza-Virusinfektionen zuschreibt. Mit der Isolierung der Erreger durch Wilson Smith et al. (1933) wurde die exakte Zuordnung dieser Erkrankung als Virusinfektion des Respirationstraktes möglich. In jedem Jahr fordern diese Erreger der „echten“ Grippe viele Todesopfer.

1.1.1. Taxonomie

Bis 1962 gehörten die Influenzaviren mit den Paramyxoviren in die Familie der Myxoviridae (Waterson, 1962) und wurden dann aufgrund der unterschiedlichen Morphologie, Genstruktur und biochemischen Eigenschaften in eine eigene Familie, die Orthomyxoviridae, eingeordnet. Innerhalb dieser Familie unterscheidet man drei Genera: Influenza A, B und C. Die Klassifizierung erfolgt aufgrund der Unterschiede in ihren Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein (M). Influenza A-Viren werden weiter in Subtypen unterteilt, da sie sich in den Hämagglutinin- (HA oder H) und / oder Neuraminidaseproteinen (NA oder N) unterscheiden. Benannt werden die Subtypen mit der Typenbezeichnung A, B oder C, der Spezies aus der die Erstisolation erfolgte, dem Ort der Erstisolation und den HA- und NA-Subtypen. So wurde das Influenza Virus A/PR/8/34 mit den HA- und NA-Subtypen H1/N1 1934 in Puerto Rico aus dem achten Isolat gewonnen.

1.1.2. Struktur und Charakterisierung von Influenza A-Viren

Influenza A-Viren sind RNA-Viren mit pleomorpher, kugeliger oder schlauchförmiger Gestalt, einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Außenhülle stellt eine Lipiddoppelschicht dar; sie stammt von der Wirtszellmembran ab und wird bei der Virusreifung von dieser übernommen. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Matrixprotein (M_1) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes, Peplomere) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Ein weiteres Matrixprotein (M_2) bildet eine geringe Anzahl von Poren innerhalb der Außenhülle.

Influenza A-Viren besitzen eine lineare Negativ-Einzelstrang RNA (ssRNA), die aus acht Segmenten besteht. Jedes der Gensegmente ist mit einem eigenen Nukleokapsid aus dem Nukleoprotein (NP) und einem RNA-Polymerasekomplex (Transkriptase) assoziiert. Die acht Segmente kodieren für zehn Proteine, wobei die beiden kleinsten Segmente 7 und 8 jeweils für zwei Proteine kodieren, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen.

1.1.3. Funktionen der viralen Proteine

Die zehn Proteine der Influenza A-Viren werden eingeteilt in Nukleoproteine, Hüllproteine, nicht-glykosylierte Proteine und Nicht-Strukturproteine (White und Fenner, 1994).

1.1.3.1. Nukleoproteine

a) Nukleoprotein (NP)

Das NP ist gemeinsam mit dem Matrixproteine das typenspezifische Antigen. Es bildet das Nukleokapsid und bewirkt das Umschalten von der Transkription zur Replikation.

b) Polymerasekomplex (P)

Der Polymerasekomplex besteht aus drei Proteinen, dem basischen Protein 1 (PB1), dem basischen Protein 2 (PB2) und dem sauren Protein (PA), die alle Kernsignale besitzen. Die Polymerase ist sowohl für die Transkription als auch für die Replikation der viralen RNA verantwortlich. Weiterhin spaltet sie neusynthetisierte zelluläre mRNAs ca. 12 Nukleotide vom 5'Cap entfernt, um den für die virale mRNA-Synthese erforderlichen Primer zu beschaffen („cap-stealing“).

1.1.3.2. Hüllproteine**a) Hämagglutinin (HA)**

Das HA liegt als Homotrimer vor. Es ist für die Erkennung eines sialinsäurehaltigen Rezeptors (N-acetylneuraminsäure) zuständig. Das HA-Molekül wird posttranslational nach dem Einbau in die Membran durch Endoproteasen (Furine) des Wirtes (Stieneke-Grober et al., 1992) in HA₁ und HA₂ gespalten, die über eine Disulfidbrücke assoziiert bleiben. Die proteolytische Spaltung des HA-Moleküls ist Voraussetzung für die Infektiosität der Viren. Hierdurch kann die Wirtsspezifität und Gewebeverteilung der Influenza A-Viren erklärt werden. HA₁ ist eine globuläres Molekül und bildet am distalen Ende die Rezeptorbindungsstelle. HA₂ ist helikal und ist mit hydrophoben Enden in der Virusmembran verankert und gewährleistet zudem die Fusion mit der Wirtszelle (Fusionspeptid am N-Terminus).

14 Subtypen des Hämagglutinins sind bekannt.

b) Neuraminidase (NA)

Das Glykoprotein Neuraminidase ist ein Homotetramer. Es besteht aus dem substratbindenden, enzymatisch aktiven Kopfteil und einem Stiel, der mit dem N-Terminus als Verankerungs- und Signaldomäne dient. Die Neuraminidase ermöglicht eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden und Glykolipiden auf Zelloberflächen. Sie ist dafür verantwortlich, daß Influenzaviren die Schleimschicht auf Epithelien durchdringen können. Zudem

verhindert es die Selbstaggregation von Viruspartikeln und erleichtert damit die Freisetzung aus infizierten Zellen.

Es sind 9 Subtypen der Neuraminidase bekannt.

Die beiden viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA tragen die wichtigsten antigenen Determinanten, welche die Ausbildung von humoralen und zellulären Immunreaktionen im infizierten Organismus bewirken. Antikörper, die gegen Hämagglutinin gerichtet sind, können das Virus neutralisieren und eine Infektion verhindern. Antikörper gegen Neuraminidase verhindern zumindest die Virusausbreitung. Sekretorische Antikörper der Klasse IgA spielen hierbei eine wichtige Rolle.

1.1.3.3. Nicht-glykosylierte Proteine

Matrixproteine (M₁ und M₂)

Die Proteine M₁ und M₂ sind auf dem bicistronischen Segment 7 kodiert. Sie entstehen durch alternatives Splicing durch Wirtsenzyme. Das M₁-Protein ist der Innenseite der Lipidhülle angelagert und reguliert die Ausknospung der Virionen. Das M₂-Protein ist ein Transmembranprotein (Lamb et al., 1985) und bildet innerhalb der Membran Ionenkanäle aus (Pinto et al., 1992), deren Funktion vermutlich darin besteht, eine Ansäuerung des Viruspartikels im Endosom zu ermöglichen, wodurch eine Konformationsänderung des Nukleokapsids auftritt und zur Dissoziation desselben führt. Die Funktion der Kanäle kann durch Amantadin gehemmt werden.

1.1.3.4. Nicht-Strukturproteine

Nicht-Strukturproteine (NS₁ und NS₂)

Die genetische Information für NS₁ und NS₂ ist auf dem Segment 8 lokalisiert; beide Proteine entstehen durch alternatives Splicing, wobei NS₁ nicht im Virion selbst gefunden wird, sondern nur in der infizierten Wirtszelle. NS₁ hemmt das Ausschleusen der viralen und zellulären mRNA aus dem Zellkern und

verhindert das Splicing der unreifen mRNA (Lamb & Krug; Fields Virology, 1996).

1.1.4. Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren

Orthomyxoviren und Retroviren stellen in sofern eine Besonderheit unter den RNA-Viren dar, da ihre Transkription und Replikation im Zellkern der infizierten Zelle und nicht im Zytoplasma stattfindet.

Die Adsorption erfolgt über einen Bindungsstelle im HA₁, das sialinsäurehaltige Glykoproteine oder Glykolipide auf der Zelloberfläche erkennt. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangen die Viren in Endolysosomen, in denen ein saures Milieu herrscht (pH 5,5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA führt zur Freilegung unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Die viralen und zellulären Membranen verschmelzen. Durch Ionenkanäle, die vom viralen M₂-Protein geformt werden, gelangen Protonen in das Virion und das M₁-Protein löst sich vom Ribonukleoprotein. Das Nukleokapsid gelangt ins Zytoplasma („Uncoating“) und der Nukleokapsid-Polymerasekomplex wird in den Zellkern transportiert.

Als Negativstrang-RNA-Virus wird die Transkription des Influenza A-Virus hauptsächlich von dem viralen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex durchgeführt. Allerdings ist dieser nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Der initiale Schritt der mRNA-Synthese wird durch einen speziellen Mechanismus der Influenza-Viren ermöglicht: der virale Polymerasekomplex spaltet einen Primer in Form eines 5'-Cap-Endes von wirtseigener, zellulärer mRNA etwa 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt ab. Die virale mRNA kann nun ins Zytoplasma transportiert werden, wo an den Ribosomen die Translation in virale Proteine erfolgt.

Das Umschalten von der Transkription zur Replikation wird durch die Konzentration an synthetisierten Nukleoproteins gesteuert. Im ersten Schritt der replikativen RNA-Synthese entstehen komplementäre Kopien von allen viralen RNA-Segmenten. Diese Positivstränge unterscheiden sich von den Positivstrangkopien der Transkription (mRNA) durch die Struktur ihrer Enden: den Replikationskopien fehlt sowohl das Cap als auch das Poly-A-Ende. Sie dienen als Matrizen für die Synthese von Minustrang-RNA-Segmenten, die mit den ursprünglichen viralen RNAs identisch sind.

Die Nukleoproteine werden aufgrund basischer Sequenzen („nuclear transport sequence“) in den Zellkern transportiert. Das Matrixprotein M_1 besitzt ein Zinkfingermotiv (Bindung von Nukleinsäuren) und bindet im Zellkern an den Komplex, der aus Nukleoprotein, Transkriptase und der Minusstrang-RNA besteht. Die Glykoproteine HA und NA werden am RER translatiert. Die Glykosylierung erfolgt im Lumen des ER und wird im Golgiapparat vervollständigt bzw. modifiziert (Polymerisation, Acylierung). In permissiven Zellen wird das Hämagglutinin in HA_1 und HA_2 gespalten, wofür zelluläre Proteasen wie z.B. Furin verantwortlich sind. HA, NA und M_2 wandern bevorzugt zur apikalen Zellmembran, der Komplex aus dem Zellkern bindet über M_1 an das HA-Trimer. M_1 vermittelt das Abschnüren der Viruspartikel von der Zellmembran („Budding“). Die Ausknospung der Viruspartikel am apikalen Zellpol wird durch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase unterstützt (Lamb & Krug; Fields Virology 1996). Die Mechanismen, die das ordnungsgemäße Einfügen jedes der 8 Nukleokapsid-Fragmente ermöglichen, sind noch unbekannt.

1.1.5. Antigendrift und Antigen shift

Influenza A-Viren können wegen ihrer hohen antigenen Variabilität immer wieder Epidemien auslösen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht immunisierte Bevölkerung treffen. So hat die Pandemie 1918 20 Millionen Menschenleben gekostet, mehr als der 1. Weltkrieg selbst. Die kleineren

Antigenveränderungen (Antigendrift) können mit der Selektion von Punktmutationen im HA-Molekül unter immunologischem Druck erklärt werden, zumal wahrscheinlich überwiegend Antikörper gegen das Hämagglutinin einen vollständigen und bleibenden Impfschutz gewährleisten. Diese Punktmutationen können zu einer Veränderung der Epitopregion führen, indem zusätzliche Asparaginreste eingefügt werden. Durch die Anlagerung einer neuen Seitenkette bei der N-Glykosylierung des Asparaginrestes wird die Antikörpererkennungsstelle maskiert. Antikörper gegen Neuraminidase gewährleisten einen nur partiellen Impfschutz. Die Matrix- und Nukleoproteine regen zwar auch die Bildung von Antikörpern an, da sie jedoch im Inneren des Viruspartikels liegen, liefern sie für die Neutralisation keinen Ansatzpunkt und sind für einen Impfschutz nicht von Bedeutung.

Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigenshift, der alle 10-40 Jahre auftritt. Unter diesem Begriff versteht man den Austausch von ganzen RNA-Gensegmenten zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei einer Doppelinfektion einer Zelle (Reassortment). Aufgrund des segmentierten Genoms tritt dieses Ereignis erheblich häufiger auf, als eine „klassische“ genetische Rekombination.

1.1.6. Pathogenese und Klinik der Erkrankung

Die Übertragung der Influenzaviren von Mensch zu Mensch erfolgt über Aerosole. Das Virus kann die Mukosa des gesamten Respirationstraktes infizieren, wo es sich über einen Zeitraum von 4-6 Tagen vermehrt. Das Spektrum der Erkrankung reicht von einer asymptomatischen Infektion bis hin zur seltenen primären Viruspneumonie, die zum Tode führen kann (Stuart-Harris, 1961). In der Regel verlaufen Infektionen mit Influenza A-Viren bei seronegativen, gesunden Personen entweder subklinisch oder als „Erkältungskrankheit“ mit den dazugehörigen Allgemeinsymptomen wie Fieber, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei Kindern treten Komplikationen in Form einer Otitis media, Sinusitis oder Tracheitis auf. Die gefürchteten Pneumonien haben entweder eine rein virale Ätiologie oder sind Folge einer

bakteriellen Superinfektion, da es aufgrund der Zerstörung mukoziliarer Funktionen leichter zu Bakterienansiedlungen kommen kann. Derartige kombinierte viral-bakterielle Pneumonien treten häufiger auf als rein virale Pneumonien. Die am häufigsten nachzuweisenden Keime sind *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Hämophilus influenzae* (Schwarzmann et al., 1971). Bakterielle Proteasen begünstigen die Virusausbreitung durch Spaltung des Hämagglutinins in HA₁ und HA₂.

Neben dem Respirationstrakt können auch innere Organe durch eine Infektion mit Influenzaviren in Mitleidenschaft gezogen werden. So können eine Pleuritis, Myocarditis, Myositis, Meningitis und sogar Embryopathien verursacht werden. Besonders gefährdet sind ältere Menschen, Menschen mit chronischen Grunderkrankungen, Patienten mit zystischer Fibrose und Immundefizienzen und andere Immunsupprimierte wie Organtransplantierte.

Bisher sind nur akute und keine chronischen Infektionen beobachtet worden. Für eine Persistenz von Influenza A-Viren im menschlichen Wirtsorganismus gibt es keine Hinweise.

1.1.7. Reaktionen des Immunsystems gegen Influenza-Viren

Die Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sind geeignet, eine effiziente Antikörperantwort auszulösen. Dabei sind IgA-Antikörper gegen Hämagglutinin, die auf die Oberflächen des respiratorischen Traktes sezerniert werden, von entscheidender Bedeutung. Sie spielen bei einer Reinfektion die Schlüsselrolle. Eine lokale IgM-Antikörper-Sekretion wird ebenso beobachtet, wie Serumantikörper der Klassen IgM, IgG und IgA nachweisbar sind.

Die Lyse der infizierten Zellen wird durch zytotoxische T-Zellen vermittelt, NK-Zellenauch durch Antikörper + Komplement.

1.2. Makrophagen-Migrationinhibitions-Faktor (MIF)

1.2.1. Charakterisierung von MIF

MIF wurde vor über 30 Jahren als eines der ersten Zytokine beschrieben. Damals kannte man nur die migrationshemmende Wirkung des löslichen Faktors auf Makrophagen, der von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird (David, J., 1966; Bloom and Bennet, 1966). Im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen entzog sich MIF sehr lange dem exakten genetisch-molekularen Nachweis und wurde erst 1989 kloniert (Weiser et al.). Inzwischen konnte MIF in sehr vielen Zellen und Geweben nachgewiesen werden und es kommen ständig neue Erkenntnisse über die Funktionen dieses „wiederentdeckten“ Zytokins hinzu.

Eine Renaissance erlebte das Interesse für MIF, als der Faktor 1993 von Bernhagen et al. in 'Nature' als Zytokin in der Adenohypophyse identifiziert wurde. Makrophagen wurden selbst als Quelle des MIF entdeckt und die Sekretion desselben als Antwort auf proinflammatorische Stimuli wie LPS, TNF- α und IFN- γ beschrieben (Calandra et al., 1994). MIF liegt in Makrophagen präformiert in intrazellulären Speichern vor. Zudem gewann MIF an Bedeutung, als seine Rolle im LPS-induzierten septischen Schock bekannt wurde, insbesondere deshalb, weil eine MIF-Blockade die Schocksymptomatik abmilderte (Bernhagen et al., 1993; Bernhagen et al., 1994; Calandra et al. 1995; Bacher et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß MIF die Freisetzung von TNF- α und IL-8 aus Makrophagen (Bernhagen et al., 1994) und aus Zellen einer bronchioalveolären Lavage bewirkt (Donnelly et al., 1997).

Verblüffend war die Erkenntnis, daß MIF enzymatische Aktivitäten aufwies: es katalysiert die Tautomerisierung von D-Dopachrom in 5,5-Dihydroxy-Indol-2-Carboxolsäure in vitro (Rosengren et al., 1996). Mittlerweile ist eine weitere

Aktivität als Protein-Thiol-Oxidoreduktase bekannt (Kleemann et al., 1998). Alle bisher beschriebenen Zytokine katalysieren dahingegen keine chemischen Reaktionen.

Einige Ergebnisse weisen darauf hin, daß die enzymatische nicht mit der biologischen Aktivität in Zusammenhang steht, andere belegten eine Abhängigkeit zwischen biologischer Aktivität und enzymatischer Funktion. Zur Zeit kann man davon ausgehen, daß MIF vielfältige biologische Funktionen besitzt, die zumindest teilweise vom enzymatisch aktiven N-Terminus abhängig sind.

Calandra (nicht veröffentlicht Angaben) setzte eine MIF-Mutante ein, die trotz Verlust der enzymatischen Aktivität die bekannte Gegenregulation (siehe nächster Absatz) zur Glukocorticoidwirkung zeigte. MIF besitzt ein invariantes, N-terminales Prolin, welches als katalytische Base arbeitet. Swope et al. (1998) setzten eine Mutante ein, bei der das Prolin durch Glycin ersetzt war und wiesen sowohl reduzierte enzymatische Aktivität als auch eine verminderte biologische Aktivität in einem Neutrophilen-Assay nach. Neutrophile wurden mit je 1 µg Wildtyp-MIF oder mit der Mutante als „Primingsignal“ behandelt und anschließend mit fMLP (formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin) stimuliert. Superoxid-Bildung diente als Maß für die Aktivierung der Neutrophilen, wobei die Mutante nur ein Viertel der durch Wildtyp-MIF verursachten Superoxid-Produktion auslösen konnte. Hermnowski-Vosatka et al. (1999) fanden eine bisher unbekannte biologische Funktion von MIF: MIF hemmt die durch MCP-1 induzierte Monozyten-Chemotaxis. Gleichzeitig aber konnten sie die Unabhängigkeit dieser Aktivität von der enzymatischen Funktion durch zwei MIF-Mutanten beweisen.

Als Gegenspieler der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung von Glukokortikoiden wurde MIF von Calandra et al. 1995-96 beschrieben. Gleichzeitig kann MIF durch niedrige Glukokortikoid-Konzentrationen (10^{-8} - 10^{-10} M) induziert werden (Calandra et al., 1995), und hebt sich somit entscheidend von allen anderen Zytokinen ab, die nur durch hohe Glukokortikoid-Dosen supprimiert werden und ansonsten keine Aktivität zeigen.

In eine ganz andere Richtung wendeten Chesney et al. (1999) den Blick, als sie Antikörper gegen MIF einsetzten, um dessen Rolle in der Angiogenese auf die Spur zu kommen. Bekannt war bereits, daß MIF-mRNA und auch das Protein selbst in Kapillaren der Haut vorkommt (Nishihira et al., 1998). In tumorassoziiertem Endothel konnte Chesney MIF nachweisen, ebenso die Eigenschaft von MIF, in mikrovaskulären Endothelien eine Zellproliferation auszulösen. Darüberhinaus konnte in einem Matrigel-Modell die Neovaskularisierung *in vivo* nachgewiesen werden. Die Verabreichung neutralisierender Antikörper gegen MIF führte in Mäusen zu signifikanter Wachstumsverlangsamung des B-Zell-Lymphoms; das verlangsamte Tumorstadium war mit einer eindeutig reduzierten Vaskularisierung des Tumors einher gegangen. Diese Ergebnisse und die Kenntnis über Struktur und enzymatische Aktivität von MIF läßt die Hoffnung auf die Entwicklung einer antineoplastisch wirksamen Substanz aufkommen, die auf der Hemmung der neovaskularisierenden Wirkung von MIF beruht.

Auch wenn der Rezeptor für MIF bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte, so gibt es doch bereits Erkenntnisse über die transkriptionelle Aktivierung des MIF-Gens (Waeber et al., 1998). In Fibroblasten konnte eine serumabhängige, erhöhte Proliferation durch MIF nachgewiesen werden, die mit der durch MIF ausgelösten Aktivierung der MAP-Kinase p44/p42 (Mitchell et al., 1999) assoziiert ist. Die Ergebnisse lassen auf einen Co-Faktor im Serum schließen, der benötigt wird, um diesen Aktivierungsweg auszulösen.

In der proximalen MIF-Promotor-Region wurde von Gérard Waeber et al. 1998 ein cAMP-responsive element (CRE) identifiziert. Mutationen in der Promotorregion um das CRE führten zu einer dramatischen Reduktion der Genaktivierung. Im Supershift-Assay eingesetzte Antikörper gegen das CRE-bindende Protein CREB bewiesen dessen Aufgabe als Vermittler in der durch den Corticotropin-Releasing-Factor (CRF) induzierte Gentranskription.

Mitchell et al. (1999) konnten einen Weg der Signalübertragung bei MIF beschreiben; sie wiesen in NIH/3T3 Fibroblasten nach, daß MIF die MAP-Kinase p44/42 aktiviert. Aus dieser Aktivierung des MAP-Kinase-Weges

resultiert die Phosphorylierung und Aktivierung der cytoplasmatischen Phospholipase A₂ (cPLA₂). Die nachfolgende Freisetzung von Arachidonsäure ist der erste Schritt hin zur Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen, deren proinflammatorische Wirkung hinreichend bekannt ist.

Wennemuth et al. (1999, in Druck) konnten unter Beweis stellen, daß es sich bei der Signaltransduktion von MIF um eine calciumabhängige Übertragung handelt. Sie blockierten die calciumabhängige ATPase des ER durch den selektiven Inhibitor Thapsigargin und konnten damit zeigen, daß MIF die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern auslöst. Auf diese Mobilisierung intrazellulären Calciums folgt dann der Einstrom extrazellulären Calciums ins Zytoplasma. Diese calciumabhängige Transduktion ist, im Gegensatz zu der MAP-Kinase-Aktivierung wie sie von Mitchell et al. gezeigt wurde, nicht serumabhängig.

1.2.2. Struktur des MIF

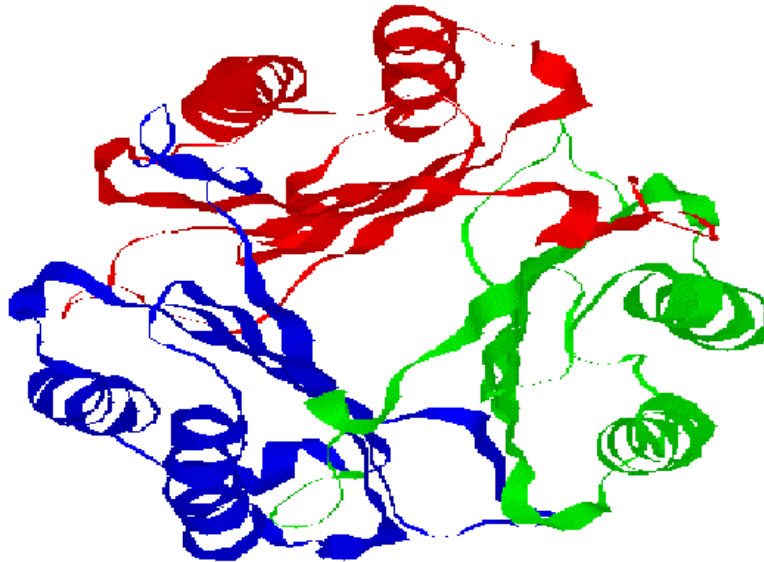
MIF fehlt, im Gegensatz zu vielen anderen Zytokinen, eine Signalsequenz. Der Sekretionsweg von MIF ist ungeklärt.

Auch seine dreidimensionale Struktur ist untypisch für ein Zytokin. Das Monomer besitzt zwei antiparallele α -Helices, die eine β -Faltblattstruktur begrenzen und erinnert damit an MHC-Moleküle und Chemokinstrukturen. Drei MIF-Monomere verbinden sich zum Trimer (Kato et al. 1996; Sun et al. 1996), die Struktur ähnelt drei mikrobiellen Enzymen, nämlich einer Tautomerase, einer Isomerase und einer Mutase.

MIF besitzt, wie bereits beschrieben, auch ein N-terminales Prolin und gleicht damit in diesem Aspekt den oben genannten Enzymen.

MIF ist dennoch nicht das einzige Protein, welches sowohl enzymatische als auch Zytokinaktivität aufweist, man denke an Thrombin (Vu et al., 1991), Cyclophilin (Sherry et al., 1992; Vu et al., 1992), Adenosin-Deaminase (Kameoka et al., 1993) oder NAP-2 (Hoogewerf et al., 1995).

Das folgende Modell zeigt die dreidimensionale Struktur des Makrophagen-Migrationsinhibitionsfaktors (MIF). Die drei Monomere (α , β , γ) formieren sich zum Trimer:



1.2.3. Die Rolle des MIF bei Erkrankungen

Bernhagen, Calandra und Bacher konnten, wie bereits erwähnt, MIF im septischen Schock eine Rolle zuschreiben. Zudem gewann MIF an Bedeutung, als seine Rolle im LPS-induzierten septischen Schock bekannt wurde (Bernhagen et al., 1993; Bernhagen et al., 1994; Calandra et al. 1995; Bacher et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß MIF die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-8 aus Makrophagen (Bernhagen et al., 1994) und aus Zellen einer bronchioalveolären Lavage bewirkt (Donnelly et al., 1997).

Die Generierung einer MIF-defizienten Maus („Knockout-Maus“) durch J.R. David verhalf dieser Arbeitsgruppe zu weiteren Erkenntnissen über die Rolle von MIF in der Sepsis (Bozza et al., 1999). Diese Mäuse erwiesen sich als

resistent gegen die sonst letalen Effekte hoher Dosen LPS oder Staphylococcus aureus-Enterotoxin B (SEB). Sie zeigten niedrigere TNF- α -Spiegel als Wildtyp-Mäuse, aber normale IL-6- und IL-10-Spiegel. Aus MIF^{-/-}-Mäusen isolierte Peritonealmakrophagen wiesen eine verminderte TNF- α -Freisetzung nach Stimulation mit LPS und IFN- γ auf, normale IL-6- und IL-12-Produktion, aber eine erhöhte Produktion von Stickoxiden (NO₃⁻ und NO₂⁻). Die Clearance gramnegativer Bakterien nach Instillation von Pseudomonas aeruginosa in die Luftröhre war bei MIF-Knockout-Mäusen sogar effizienter als bei Wildtyp-Mäusen. In der bronchioalveolären Lavage dieser MIF^{-/-}-Mäusen war die Akkumulation neutrophiler Granulozyten geringer. Derselbe Effekt ist von CD-14-Knockout-Mäusen bekannt (Haziot et al., 1996), was vermuten läßt, daß die Abwehr bakterieller Infektionen ohne LPS-induzierte inflammatorische Zytokine effektiver ist.

1.3. Chemokine

Die Bezeichnung „Chemokine“ leitet sich aus „*chemoattractant cytokines* ab“ und benennt solche Zytokine, die die Funktion der Anlockung von Leukozyten erfüllen, also chemotaktisch wirksam sind. Chemokine werden von den unterschiedlichsten Zellen sezerniert und bilden im Extrazellulärraum einen Gradienten aus, an dem sich Leukozyten entlangbewegen, um an den Ort der Entzündung zu gelangen. Dabei sind die Chemokine an Molekülen der extrazellulären Matrix fixiert (Haptotaxis) (Tanaka et al., 1993). Proteoglykanbindungsstellen (beispielsweise für Heparin) der Chemokine gewährleisten die Retention in der extrazellulären Matrix der Gefäßwand. Chemokine leiten Signale weiter, die zur Reorganisation des Zytoskeletts führen, sie aktivieren Integrine und andere Funktionen, die zur erhöhten Adhäsion an Endothelzellen und Migration der Zellen führt (Schall et al., 1994; Imhof et al., 1995). Sie können Zellen zu erhöhter Funktion aktivieren und induzieren Degranulation (respiratory burst)

1.3.1. Struktur und Funktion der Chemokine

Charakteristisch für alle Mitglieder der Chemokin-Familien sind die konservierten Cystein-Reste, die durch Bildung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur der Chemokine bedingen.

Die vier Familien der Chemokine unterscheiden sich in den Cystein-Resten am Amino-Terminus des Moleküls. Üblicherweise werden die Chemokine anhand der Position der ersten beiden Cystein-Reste unterteilt (Baggiolini et al., 1994): C- CC-, CXC-und CX₃C-Chemokine.

Die CXC-Familie besitzt im Gegensatz zu den Mitgliedern der CC-Familie eine Aminosäure zwischen zwei Cysteinen. Die strukturelle Einteilung der Chemokine scheint im wesentlichen mit dem Wirkungsspektrum

übereinzustimmen, denn meisten CXC-Chemokine attrahieren neutrophile Granulozyten, während CC-Chemokine vorwiegend mononukleäre Zellen anlocken.

Innerhalb der CXC-Gruppe unterscheidet man die Proteine mit ELR-Motiv (Glutaminsäure-Leucin-Arginin) an der aminoterminalen Region von denen ohne ELR-Motiv, wobei die Vertreter der CXC-ELR-Gruppe auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken (z.B. IL-8, GRO- α), die chemotaktische Wirkung der Proteine ohne ELR-Motiv dagegen gleicht der der CC-Chemokine (z.B. MCP-1, MIP-1 α , RANTES), die vorzugsweise auf mononukleäre Zellen wirken.

Den Vertretern der C-Familie fehlen der erste und dritte der vier konservierten Cystein-Reste. Als einziger Vertreter der C-Chemokine ist bis heute das Lymphotaktin bekannt, es wirkt auf Lymphozyten chemotaktisch (Kelner et al., 1994).

Die relativ neu beschriebene Familie der CX₃C-Chemokine weist entsprechend drei Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cystein-Resten auf und verfügt weiterhin über die Besonderheit der Membranständigkeit. Die zuerst als voneinander unabhängige Vertreter der CX₃C-Gruppe beschriebenen Chemokine Fractalkine, das auf aktivierten Endothelzellen entdeckt wurde (Bazan et al., 1997) und Neurotactin (Pan et al., 1997), welches verstärkt auf aktivierten Mikrogliazellen des Gehirns gefunden wurde, erwiesen sich als identische Moleküle. Fractalkine weist eine 18 Aminosäuren lange, hydrophobe Sequenz auf, welche den Membrananker bildet. Membranständiges Fractalkine kann auf primären Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine induziert werden und bindet dann Monozyten als auch T-Lymphozyten. Auch die lösliche Form des Fractalkins zeigt deutlichen, chemotaktischen Einfluß auf Monozyten und T-Zellen. Der Chemokindomäne des als Neurotactin bezeichneten Moleküls wurde von Pan et al. als ausschließlich auf neutrophile Granulozyten wirkend beschrieben. Bereits Ende des Jahres 1997 konnte der CX₃C-Rezeptor für Fractalkine beschrieben werden (Imai et al., 1997).

Chemokine sind Moleküle aus ungefähr 70-80 Aminosäuren, deren Tertiärstruktur durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten bzw. zweiten und vierten Cysteinrest bestimmt wird. Die Sequenzhomologie zwischen den Familien der Chemokine CC und CXC beträgt lediglich 20%, aber dennoch weisen Strukturanalysen auf ähnliche dreidimensionale Strukturen hin (Gronenborn et al., 1991).

Die Zahl der beschriebenen Chemokine ist inzwischen auf über 60 angestiegen und man ist dazu übergegangen, eine Einteilung vorzunehmen, die die allgemeine Funktion der Chemokine als Kriterium nimmt. Die eine Gruppe wird von denjenigen Chemokinen vertreten, die durch inflammatorische Stimuli induziert oder hochreguliert werden und somit in entzündlichen Reaktionen involviert sind, sie werden als „inflammatorische Chemokine“ beschrieben. Dazu gehören die oben genannten Chemokine wie IL-8, GRO- α , MCP-1, -2, -3, -4, RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β .

Die zweite Gruppe sind die sogenannten „konstitutiven Chemokine“; diese werden im Knochenmark, im Thymus und in sekundären lymphatischen Organen gebildet und sind verantwortlich für die Kontrolle der Leukozytenwanderung und die Regulation der miteinander kommunizierenden Zellen, die eine Immunantwort ausbilden sollen (Yoshie et al., 1997). Vertreter dieser Gruppe sind SLC (secondary lymphoid tissue chemokine), ELC (EBV-induced molecule 1 ligand chemokine = MIP-3 β), DC-CK1 (dendritic cell chemokine 1), PARC (pulmonary and activation-regulated chemokine), MDC (macrophage-derived chemokine) und TARC (thymus and activation-regulated chemokine). Diese gehören, wenn man die Einteilung nach der Struktur beibehält, zu den CC-Chemokinen und attrahieren mononukleäre Zellen.

Tabelle 1: Chemokin-Familien und ihre Vertreter.

Familie	Chemokin		Produzenten	Zielzellen
C	LTN	Lymphotactin	T, NK, Mast	T, NK
CC	MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein -1 α	M, T, B, F	M, T, NK, N, Baso, Eo, Mast, DC, B
	MIP-1β	-1 β	M, T; B; F	M, T, NK, DC
	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	M, N, F, Kera, Endo	M, T, B, DC, NK
	MCP-2	-2	M	M, T, Eo, Mast
	MCP-3	-3	M	M, T, Baso, Eo, DC
	MCP-4	-4	F, Endo	
CC	RANTES	Regulated on Activation, Normal T- cell Expressed and Secreted	T, M, P	M, T, NK, Eo, DC, Baso
	TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine	DC, Kera	T
	PARC	Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine	M, DC	T

	MDC	Macrophage-Derived Chemokine	M, DC	T
CXC	IL-8	Interleukin-8	M, N, T, F, Endo, Kera	N, T M, NK, Baso, Eo
	GRO-α	Growth Related Oncogene- α	M, N, F, Kera, Endo	N, T
	GRO-β	- β	M, N, F, Endo	N
	GRO-γ	- γ	M, N, F, Endo	N
	NAP-2	Neutrophil Activating protein-2	M, Endo	N
	IP-10	IFN- γ inducible Protein-10	M, F, Kera, Endo,	T, NK, M, Kera
	MIG	Monokine Induced by IFN- γ	T	T, M, Endo
	SDF-1	Stromal Cell Derived Factor-1	M, Endo	B, T, M, P
CX₃C	Fractalkine/ Neurotactin		Endo, Mikroglia	T, M, N, NK

Abkürzungen: B: B-Lymphozyten; Baso: basophile Granulozyten; DC: dendritische Zellen; Endo: Endothelzellen; Eo: eosinophile Granulozyten; F: Fibroblasten; Kera: Keratinozyten; M: Monozyten; Mast: Mastzellen; N: neutrophile Granulozyten; NK: natürliche Killerzellen; P: Thrombozyten; T: T-Lymphozyten.

1.3.2. Chemokinproduzierende Zellen

Monozyten und Makrophagen können sowohl CC- als auch CXC-Chemokine sezernieren; dazu gehören IL-8 (Schröder et al., 1987), MCP-1 (Colotta et al., 1991), MIP-1 α und - β und RANTES. Die Produktion kann beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α induziert werden, ebenso durch LPS und andere mikrobielle Produkte.

Lymphozyten produzieren RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β , also vor allem CC-Chemokine.

Neutrophile Granulozyten können durch Stimuli wie LPS, PAF oder fMLP (formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin) zur Chemokinproduktion angeregt werden. Dabei handelt es sich um IL-8 (Bazzoni et al., 1991), MCP-1 und MIP-1 α (Kasama et al.; Pauligk, 1997).

Auch in den meisten Gewebezellen sind Chemokine induzierbar; insbesondere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α und mikrobielle Produkte bewirken eine Induktion von CC- und CXC-Chemokinen (Baggiolini et al., 1994).

1.3.3. Chemokine vermitteln Leukozytenwanderung und -aktivierung

Die Voraussetzungen, die zur Wanderung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem an den Ort der Entzündung erfüllt sein müssen, sind das Vorhandensein entsprechender Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen, die Adhärenz der Leukozyten auf Endothelzellen, die Diapedese und die Einwanderung der Zellen ins Gewebe entlang eines chemotaktischen Gradienten.

Diese Vorgänge laufen in drei Stufen ab („three step model“; Butcher, 1991): Schwache Interaktionen von Selektinen auf der Endotheloberfläche mit den entsprechenden Rezeptoren (Kohlenhydratepitope von Glykoproteinen) auf Leukozyten erlauben ein „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothel („Rolling“). Die Expression von Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie (z.B. ICAM-1) kann zum Beispiel durch Zytokine und Chemokine verstärkt werden („Aktivierung“). Dies führt zu einer verstärkten Adhärenz von Leukozyten an die Endothelzellen und das Entlangrollen endet. Die Leukozyten durchqueren das Endothel (Diapedese) und wandern zum Entzündungsherd („Extravasation“).

Chemokine wirken selektiv auf verschiedene Subpopulationen von Leukozyten; CXC-Chemokine wirken auf neutrophile Granulozyten, CC-Chemokine sowohl auf Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen, als auch auf basophile und eosinophile Granulozyten (Schall et al., 1994).

Chemokine binden an Proteoglykanmoleküle in der extrazellulären Matrix und auf Endothelzellen. Auf diese Weise werden sie nicht vom Blutstrom weitergespült, sondern bilden einen chemotaktischen Gradienten aus, an dem die Leukozyten entlangwandern können.

Chemokine bewirken nicht nur die Chemotaxis von Leukozyten, sondern können diese zusätzlich aktivieren. Dazu gehören die Freisetzung intrazellulärer Granula, erhöhte Rezeptorexpression, die Bildung von bioaktiven Lipiden des Arachidonsäurestoffwechsels und die Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite. Interleukin-8 und GRO- α werden, in Kombination mit Wachstumsfaktoren, eine Wirkung auf die Regeneration von Geweben zugeschrieben.

Chemokine sind vermutlich auch an der Ausprägung einiger Erkrankungen beteiligt. So ist beispielsweise bei der Psoriasis eine Überproduktion von IL-8 nachgewiesen worden, die für die massive Infiltration mit neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Schröder et al., 1992). Das IL-8 stammt aus den bei dieser Erkrankung stark proliferierenden Keratinozyten. Erhöhte IL-8-

Spiegel finden sich weiterhin bei akuten Entzündungen der Lunge (Miller et al., 1992), in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Rampart et al., 1992) und auch bei allergischem Asthma (Marini et al., 1992).

1.3.4. Chemokinrezeptoren

Chemokine binden an Rezeptoren, die zur Familie der heptahelikalen (7fach membrandurchspannenden), an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren gehören (Rhodopsin-Superfamilie). Die CXC-Chemokine bindenden Chemokinrezeptoren werden als CXCRs, entsprechend die CC-Chemokine bindenden als CCRs bezeichnet. Es wurden bisher 5 CXC-Rezeptoren und 10 CC-Rezeptoren identifiziert.

1.3.4.1. CXC-Chemokinrezeptoren

CXCR1 wird hauptsächlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert, aber auch auf Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten und auf bis zu 25% der Lymphozyten (CD8+ T-Zellen und NK-Zellen) (Chuntharapai et al., 1994). Dieser Rezeptor bindet spezifisch nur IL-8 (IL8RA).

CXCR2 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie CXCR1, kann aber neben IL-8 (IL8RB) auch GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2 und ENA-78 binden (CXC-Chemokine mit ERL-Muster).

CXCR3 wird nur auf aktivierten T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert, IP-10 und Mig binden an diesem Rezeptor.

CXCR4 wird neben der Expression auf Leukozyten auch auf anderen Geweben gefunden, beispielsweise auf Organen wie Herz, Gehirn, Leber und Darm. Außerdem konnte seine Funktion als Co-Rezeptor für die HIV-Infektion nachgewiesen werden (Feng et al., 1996).

CXCR5 wurde zunächst auf B-Zellen beschrieben als Rezeptor für BCA-1 (B-cell-attracting chemokine 1), findet sich aber auch auf CD4 positiven T-Zellen. Neueste Erkenntnis ist die Funktion des CXCR5 als Co-Rezeptor für HIV-2.

1.3.4.2. CC-Chemokinrezeptoren

CCR1 bindet hochaffin MIP-1 α und RANTES, auch MCP-3.

CCR2 liegt in zwei Splicing-Formen vor, wobei sich die Signaltransduktionen unterscheidet, nicht die Bindung der Liganden. Hier bindet MCP-1, -2, -3, und MCP-4.

CCR3 (Eotaxin-Rezeptor) wird vornehmlich auf Eosinophilen exprimiert und bindet Eotaxin, MCP-2, -3 und -4 als auch RANTES. Diesem Rezeptor wird eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen auf Allergene zugeschrieben.

CCR4 bindet MIP-1 α und MCP-1 und ist ein weiterer Rezeptor für RANTES. Hier bindet auch TARC und MDC.

CCR5 bindet ebenfalls RANTES, darüber hinaus MIP-1 α und MIP-1 β . Auch diesem Rezeptor kommt eine Rolle als Co-Rezeptor in der HIV-Infektion zu.

CCR6 bindet MIP-3 α und LARC. Exprimiert wird dieser Rezeptor auf T-Lymphozyten und auf dendritischen Zellen.

CCR7 bindet SLC und MIP-3 β (ELC). Er wird auf B- und T-Lymphozyten exprimiert und ist an der Interaktion zwischen diesen und Endothelzellen (HEV) beteiligt.

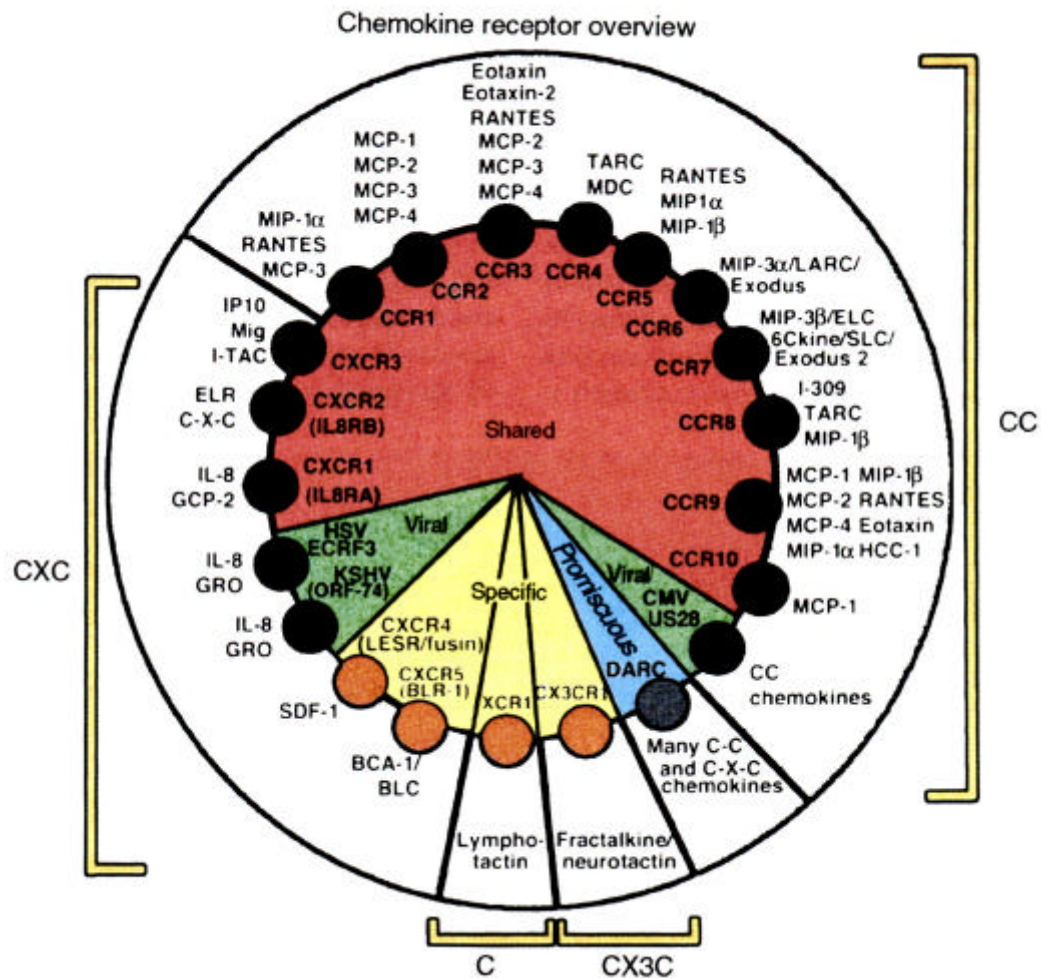
CCR8 bindet MIP-1 β und TARC, seine Expression ist auf lymphatisches Gewebe beschränkt und scheint eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung zu spielen.

CCR9 bindet MCP-1, -2, und -4, MIP-1 α und -1 β , RANTES und Eotaxin.

CCR10 ist ein weiterer Rezeptor für MCP-1 und -3.

Alle Chemokinrezeptoren sind durch das G-Protein g_i an Phospholipase β_2 gekoppelt und somit kann das „second messenger system“ über Inositoltriphosphat und Diacylglycerol aktiviert werden.

Übersicht über Chemokinrezeptoren (nach Steven Kunkel, 1999)



1.4. Zielsetzung

Die Gewebe des unteren Respirationstraktes unterliegen während einer Influenza A-Virusinfektion einer raschen und massiven Schädigung. Die Erkrankung setzt abrupt ein, bereits innerhalb eines Tages nach Beginn der Symptomatik wird eine Desquamation des Flimmerepithels und der schleimproduzierenden Zellen beobachtet (Murphy & Webster; Fields Virology, 1996).

Isolierte Lungenepithelzellen stellen als Zielzellen dieser Infektion ein *in vitro*-Modell dar, anhand dessen das Reaktionsspektrum dieser Epithelien untersucht werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression des Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) in den alveolären Zellen A549, den bronchiolären Zellen U1752 und in primären Bronchialepithelzellen zu untersuchen und eine mögliche Freisetzung dieses als proinflammatorisch beschriebenen Zytokins nach Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8/34 nachzuweisen. Die Beteiligung von MIF in der Sepsis und bei ARDS (acute respiratory distress syndrome) ist bereits beschrieben worden, seine Rolle bei Viruserkrankungen ist bisher kaum bekannt. Es ist naheliegend, daß MIF hier eine Funktion in der Regulation einer Immunantwort erfüllt.

Das histopathologische Bild einer Influenza-Infektion ist durch eine Chemotaxis-induzierte Einwanderung von immunkompetenten Zellen geprägt. Eine entscheidende Rolle dürften Chemokine spielen, deren Freisetzung in Epithelien der Lunge nachweisbar sein sollte.

Epithelzellen könnten somit eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Immunantwort spielen. Ziel dieser Arbeit war auch, proinflammatorische Chemokine nachzuweisen, die aus den Lungen-Epithelzellen unter Einfluß einer Influenza A Virus-Infektion sezerniert werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, welcher Mechanismus zum dramatischen Absterben der Zellen führt (Nekrose oder Apoptose) und welchen Einfluß proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α auf die Freisetzung von MIF und Chemokinen haben.

2. Material und Methoden

2.1. Medien, Zellkulturen und Virusstamm

2.1.1. Medien

Die verwendeten Zelllinien A549 und U1752 wurden in RPMI 1640 Medium (Linares) gehalten, die Linien für Bioassays MDCK II und HeLA in MEM (Biochrom). Beiden Medien wurden die nachfolgend aufgeführten Lösungen Glutamin (Endkonzentration 2 mM) und Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 U/ml bzw. 100 µg/ml) zugesetzt. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Mengen fötalen Kälberserums (FCS) zugegeben.

Die Stammlösungen waren:

L-Glutamin 200 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein

Die humanen, primären Bronchialepithelzellen wurden in Basalmedium für Bronchialepithelzellen mit Zusätzen subkultiviert (Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen): BPE (bovine pituitary extract), Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Transferrin, Trijodthyronin, hEGF (human epidermal growth factor).

2.1.2. Zellen

2.1.2.1. Bronchioläre Zelllinie U1752

Die humane, adhärent wachsende bronchioläre Zelllinie wurde 1981 von Bergh etabliert und beschrieben (Bergh et al., 1981). Es handelt sich um eine aus einem großzelligen Plattenepithelkarzinom isolierte, permanent wachsende

Linie. Die Zellen wurden im oben genannten Medium mit 5% FCS kultiviert und zweimal wöchentlich 1:10 umgesetzt, im Versuch wurde das Medium mit lediglich 1% FCS eingesetzt. Die Zellen wurden in maximal 15 Passagen subkultiviert.

2.1.2.2. Alveoläre Zelllinie A549

Diese humane Zelllinie wurde aus einem explantierten Lungentumor 1972 etabliert (Giard et al., 1973). Die Zellen entstammen Pneumozyten vom Typ II. Die adhären wachsende Zelllinie wurde ebenfalls in RPMI 1640 mit 5% FCS kultiviert, in maximal 15 Passagen subkultiviert (1:10, zweimal / Woche) und im Versuch mit 1% FCS gehalten.

2.1.2.3. Primäre humane Bronchialepithelzellen (normal human bronchiolar epithelial cells: NHBE)

Diese Primärzellen wurden von Cell Systems Biotechnologie (St. Katharinen) bezogen. Sie werden aus normalem, humanem Spendergewebe (keine Tumorpatienten) isoliert und sind mit Analysenzertifikat versehen. Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurden die Zellen in Basalmedium plus Zusätzen subkultiviert. Die Zellen wurden in der 3. Passage in den Versuch eingesetzt.

2.1.2.4. Zellen in Bioassays

MDCK II-Zellen (Madin and Darby Canine Kidney) sind Nierenepithelien, die 1958 aus einem Cockerspaniel isoliert wurden. Die Linie diente zur Bestimmung von Influenza A-Virustitern. Sie sind nur wenig trypsinempfindlich, so daß diese Protease für bestimmte Untersuchungen den Zellkulturüberständen zugesetzt werden kann, ohne den Zellen z.B. in einem Plaquetest zu schaden.

Die Zellkulturen wurden als offenes System in einem Auto-Zero-Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, ca. 95% relativer Luftfeuchte und Begasung mit 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellkultur- und sonstigen sterilen Arbeiten wurden in einer Laminar-Flow-Box (HLB 2448; Heraeus) durchgeführt.

Alle Zellzählungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen wurden auf Mycoplasmen- und Endotoxinkontaminationen überprüft (siehe Material und Methoden: 1.2.4 Testsysteme in der Zellkultivierung). Ungeeignete Reagenzien wurden verworfen.

Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tisch-Zentrifuge (Hettich Rotanta/RP Rotor max. 4000 rpm; Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

2.1.3. Testsysteme in der Zellkultivierung

2.1.3.1. Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen können zu einer Aktivierung und damit zu einer Mediatorfreisetzung aus den Zellen führen. Deshalb wurden alle verwendeten Zellkulturen auf mögliche Mykoplasmenkontaminationen untersucht.

Zum Nachweis wurde der Mycoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Auswertung erfolgte über ein Plattenphotometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf).

2.1.3.2. LAL-Test (Limulus amoebocyte lysate- test) zum Nachweis von Endotoxin

Um eine unspezifische Aktivierung von Zellen auszuschließen, wurden die für die Zellkulturen verwendeten Medien, Seren, Virussuspensionen und Reagenzien mit Hilfe des Limulus-Tests (Whittaker, Walkersville) auf ihren Endotoxingehalt hin überprüft. Die Werte lagen stets unter der Nachweisgrenze von 0,1 EU/ml.

2.1.4. Virusstamm

Das humane Influenza A-Viren A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Durch häufiges Passagieren im Hühnerei kann das 1934 isolierte Virus als adaptiert angesehen werden. In dieser Arbeit wird das folgende Kürzel für das Virus verwendet: A/PR/8/34.

2.2. Methoden

2.2.1. Infektion der Lungenepithelzellen

Die beiden Lungenepithel-Linien wurden mit $0,25 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung (Nunc; 24 well) ausgesät und über Nacht in RPMI 1640 mit 5% FCS gehalten. Am Versuchstag wurden die Zellen mit PBS⁺⁺ (phosphate buffered saline with Ca^{2+} and Mg^{2+}) serumfrei gewaschen. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 2 MOI (multiplicity of infection) A/PR/8/34 für 1 h bei 37°C in 250 µl serumfreien Medium. Danach wurde mit RPMI/1%FCS auf 1ml aufgefüllt.

Primäre humane Bronchialepithelzellen wurden in Kulturschalen mit 6 cm Durchmesser ausgesät (2×10^6 Zellen in 3 ml) und über Nacht in Basalmedium kultiviert. Am Versuchstag wurden sie mit HBSS (HEPES buffered saline solution) gewaschen und wie oben beschrieben in 1 ml Basalmedium infiziert. Nach 1 Stunde wurde das Medium auf 3 ml ergänzt.

2.2.1.1. Gewinnung von Zellüberständen

Die Überstände wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen, abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2. Gewinnung von Zellysaten

Die Proteingewinnung aus Zellysaten wurden mit der Trizol-Methode (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Protein-Präparation wurden die Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen mit einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Ansatz durchgeführt. Die Infektion der Zellen erfolgte in Analogie wie unter 2.2.1. beschrieben. Die Zellen jeder Petrischale wurden mit 2 ml Trizol-Reagenz versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Das Zellysate wurde mit Hilfe von Gummischabern aus den Gewebekulturschalen abgelöst und zum Scheren der DNA mehrfach durch eine Kanüle (24g) aufgezogen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Gesamtproteinmenge mittels BCA-Kit (Pierce, Rockford) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.2. Vermehrung und Reinigung von Influenza A-Viren

Orthomyxoviren replizieren gut in entodermalem Gewebe, deshalb können sie in 11 Tage alten Hühnerembryonen vermehrt werden, wobei ein Virustiter von 10^9 - 10^{10} PFU/ml erreicht werden kann (Burnett, 1936; Barrett, 1985). Man injiziert das Virusinokulum in die Allantoishöhle, von der aus sich eine systemische Infektion entwickelt. Die Gewinnung der Viren erfolgt 2 Tage nach Infektion aus der Allantoisflüssigkeit, die durch mehrere Zentrifugationsschritte einschließlich einer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt wird.

2.2.2.1. Vorbereitung der Eier und Beimpfung

Befruchtete Hühnereier wurden 11 Tage bei 37°C und einer relativen Luftfeuchte von 40-60% im Inkubator bebrütet und dabei alle 6 Stunden automatisch gewendet. Mit Hilfe einer Schierlampe (Blohm Apparatebau, Hamburg) wurden die Embryonen auf Vitalität (Eigenbeweglichkeit, Gefäßzeichnung) hin überprüft und zur Beimpfung ausgewählt. Nach Markierung der Luftkammergrenze am stumpfen Eipol wurde dort die Kalkschale mit Jodlösung (0,05 Mol J_2 /l, Titrisol, Merck, Darmstadt) desinfiziert. Innerhalb der Kennzeichnung wurde die Schale an einer gefäßarmen Stelle angebohrt und 0,2 ml Virussuspension mit einer feinen Kanüle (24G x 1"; 0,55 x 25 mm) vertikal injiziert. Als Virusinokulum diente native virushaltige Allantoisflüssigkeit 1:1000 in PBS^{def} (phosphate buffered saline without Ca^{2+} and Mg^{2+}) verdünnt. Die Injektionsstelle wurde zum Schutz vor Infektion mit Holzleim verschlossen und die Eier für 2 Tage bei 37°C und 80% Luftfeuchte inkubiert. Vor Ernte der Allantoisflüssigkeiten wurden bereits abgestorbene Embryonen mit Hilfe der Schierlampe aussortiert.

2.2.2.2. Ernte der Allantoisflüssigkeit

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C unter sterilen Bedingungen.

Die Lagerung der verwendeten Eier bei 4°C über Nacht führte zur Gefäßkonstriktion und somit zum Absterben der Embryonen. Nach Desinfektion des Eipols wurde die Kalkschale oberhalb der Luftkammergrenze entfernt und die Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle (20G x 1,5"; 0,9 x 40 mm) und einer 10 ml -Spritze abgesaugt. Nur klare Flüssigkeit wurde in einem sterilen Glasgefäß auf Eis gesammelt, jede hämorrhagische, dottergelbe oder weißlich trübe Verunreinigung verworfen. Aus jedem Ei konnten 7-12 ml Allantoisflüssigkeit geerntet werden.

2.2.2.3. Reinigung der Influenza A-Viren

Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte 30 min bei 6000 rpm ohne Bremse (Rotor JA-10 Beckman Zentrifuge J21) und diente zur Sedimentation von Zellen und Zelltrümmern.

Das Virus im Überstand wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 18000 rpm in Ultra-ClearTM-Tubes (Rotor SW 28, Beckman Zentrifuge L7-55) pelletiert, der Überstand verworfen und das Viruspellet mit 500 µl PBS^{def} zur Quellung 1 h auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde sorgfältig mittels einer 1 ml-Tuberkulinspritze mit feiner Kanüle resuspendiert. Ein vorher angefertigter, kontinuierlicher 30-55% (w/w) Saccharosegradient (in Ultra-ClearTM-Tubes) wurde nun mit der Virussuspension vorsichtig überschichtet und bei 4°C 16 h mit 24000 rpm ohne Bremse (Rotor SW 28) zentrifugiert. Das Virus befand sich danach in einer weißlich trüben Bande im Gradienten (bei ca. 45% Saccharose), die abpipettiert und in kaltem PBS^{def} aufgenommen wurde.

Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1 h bei 24000 rpm, ohne Bremse, Rotor SW 28) ließ man das Pellet erneut in PBS^{def} quellen und resuspendierte

wie oben beschrieben. Verbliebene Virusaggregate konnten durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm entfernt werden.

2.2.2.4. Dialyse und Lagerung

Der verwendete Dialyseschlauch (Visking, 1,5-3 nm Porenweite; Roth) wurde in EDTA-Lösung (100 mmol Na₂-EDTA-Lösung; Serva) aufgekocht, um unerwünschte Substanzen wie Glycerin, Spuren von Schwefelverbindungen und Schwermetallen zu entfernen. Die Virussuspension wurde in den Schlauch eingefüllt und 21 h bei 4°C gegen das 500-fache Volumen PBS^{def} dialysiert.

Im parallel durchgeführten Hämagglutinations (HA)-Test (siehe unter 2.2.3.) wurde der Virustiter in Hämagglutinationseinheiten HAU /ml ermittelt. Das Dialysat wurde auf einen Titer von 10⁵ HAU/ml eingestellt und in Aliquots von 250-500 µl bei -170°C gelagert.

Zur Überprüfung der Keimfreiheit wurde die Virussuspension auf verschiedenen Kulturmedien (Thioglykolat-Bouillon, Endo-Agar, Blut-Agar) ausgetestet, zur Feststellung der Endotoxinfreiheit wurde der LAL-Test (siehe 2.1.3.2.: Limulus Amebocyte Lysate-Test; QCL-1000; Fa. Bio Whittaker) durchgeführt.

2.2.3. Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der HA-Test dient zur quantitativen Bestimmung von Viren, welche die Fähigkeit besitzen, Erythrozyten zu agglutinieren. Man erfaßt damit nicht nur die infektiösen, sondern auch die defekten Viruspartikel. Der Test wurde in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) durchgeführt. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8,...) in einem Volumen von 50 µl PBS^{def} wurden zu jeder Verdünnung 50 µl einer 0,5% Hühnererythrozytensuspension gegeben. Der Test konnte nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur abgelesen werden. Erythrozyten, die nicht agglutiniert wurden, sedimentierten

unter Knopfbildung. Der HA-Titer wird in hämagglutinierenden Einheiten (HAU/ml) angegeben und stellt den reziproken Wert der höchsten Verdünnungsstufe dar, die noch eine vollständige Agglutination bewirkt.

2.2.4. Plaque-Test

Der Plaque-Test dient zur quantitativen Bestimmung von infektiösen Viruspartikeln. Nach Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe aus der zu bestimmenden Virussuspension (10^{-1} - 10^{-9}) wurde ein Zellrasen aus permissiven MDCK II-Zellen mit je 333 μ l aus den verschiedenen Virusverdünnungen infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurden die Zellen mit 0,5% Agar in RPMI 1640 überschichtet, um eine unerwünschte Ausbreitung der Viren per Diffusion durch das Medium zu verhindern. Ein infektiöses Virus führte zur Ausbildung eines „Plaques“ (Tobita et al., 1975). Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die Plaques durch Anfärbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Der Farbstoff wurde nur von intakten Zellen aufgenommen, die Plaques erschienen als helle Läsionen und konnten ausgezählt werden. Der Virustiter wurde als Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (PFU)/ml angegeben.

Reagenzien und Medien:

2,5 % Trypsin wurde 1:10 verdünnt, davon je 4 μ l /100 μ l Probe eingesetzt.

0,5% Agarose-Medium : 0,5 g Agarose L (Behringwerke, Marburg) wurden in 100 ml A.dest. aufgekocht. Parallel wurde zweifach konzentriertes RPMI^{sup} angesetzt:

10 ml RPMI^{sup} (10 x)

je 0,5 ml Glutamin, Pyruvat, HEPES-Puffer, Penicillin/Streptomycin

5,5 ml Bicarbonat (Biochrom, 7.5%)

ad 50 ml A. dest.

Beide Lösungen wurden im Wasserbad auf 41°C gehalten und kurz vor Gebrauch gemischt.

Kristallviolett (KV)-Stammlösung

2% (w/v) Kristallviolett (Serva) in:

0,2 Vol 96% -igem Ethanol

0,1 Vol Formalin

0,7 Vol A.dest

Färbelösung

0,1 Vol Stammlösung

0,1 Vol Formalin

0,8 Vol A.dest

2.2.5. Inaktivierung von Influenza A-Viren

2.2.5.1. UV-Inaktivierung

Hierzu wurde die Virusstammlösung in Vertiefungen von 4-Loch-Platten (Nunc; Nunc, Wiesbaden) pipettiert und auf Eis bei einer Wellenlänge von 254 nm (MinUvis, Desaga) für 45 min bestrahlt.

2.2.5.2. Inaktivierung bei 56°C

100 µl der Virustammlösung wurde im Einfrierröhrchen für 45 Minuten im Wasserbad bei 56°C inkubiert.

2.2.5.3. Inaktivierung bei 100°C

250 µl wurden im Einfrierröhrchen für 15 Minuten gekocht.

Die Virussuspensionen wurden nach der Inaktivierung auf Eis gelagert und kurz vor Zugabe zu den Zellen in RPMI^{sup} verdünnt.

Die erfolgreiche Inaktivierung wurde jeweils im Plaquetest überprüft.

2.2.6. Konzentrierung der Zellkulturüberstände

Um einen Nachweis von MIF im Westernblot zu ermöglichen, mußten die Proben vorher ankonzentriert werden. Die Überstände wurden in Centricon-10-Konzentratoren (Amicon über Millipore, Eschborn) gegeben und bei 6000 rpm für 70 Minuten bei 12°C zentrifugiert. Es handelt sich bei dieser Methode um eine Ultrafiltration durch eine anisotrope Membran. Nur größere Moleküle bleiben entsprechend der Porengröße der Membran im Probenreservoir zurück.

2.2.7. Western Blot für MIF

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt.

Die Elektrophoresen wurden in einer Novex-Gelkammer durchgeführt (4-12%-ige Bis-Tris Gradientengele). Die Proben wurden in Novex-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen (Novex, Frankfurt).

Der Gellauf erfolgte in MES-Puffer unter reduzierenden Bedingungen bei konstant 200V in 35 Minuten. Das Blotting auf die Transfermembran erfolgte in

Blot-Modulen (Novex, Frankfurt) in Transferpuffer in 60 Minuten bei konstant 25V.

Es wurden Überstände von Zellkulturen eingesetzt (Gewinnung siehe 2.2.1.1., Konzentrieren der ÜS siehe 2.2.6.), und es wurden Zellysate eingesetzt, dabei wurden jeweils 2 µg Gesamtprotein/Spur aufgetragen (Gesamtproteinbestimmung: BCA-Kit, Pierce, Rockford).

Zur Detektion wurden die Antikörper folgendermaßen eingesetzt:

1. polyklonaler MIF-Antikörper (Kaninchen) 1:6000 in PBS/0,5% Tween
2. anti.rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:250000 in PBS/0,5% Tween (Pierce)

Als Waschpuffer diente PBS/0,5% Tween; die Waschschrte wurden jeweils 3x15 min ausgeführt.

Das Chemolumiszenz-Substrat (SuperSignal; Pierce) wurde nach Anweisung des Herstellers gemischt und die Membran 5 min inkubiert.

Die Membran wurde einem Röntgenfilm exponiert, wobei die Expositionszeiten 5 Sekunden bis 30 Sekunden betragen können. Die Filmentwicklung erfolgte mit Chemikalien der Agfa-Gefaert AG, Leverkusen (Entwickler G 152; Fixierer G 354).

2.2.8. MTT-Färbung

Stoffwechselaktive Zellen sind mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenase in der Lage, das Tetrazoliumsalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) MTT in ein blaues, wasserunlösliches Formazanderivat zu reduzieren. Die optische Dichte des Farbstoffs ist dem Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen direkt proportional (Mosmann, 1983).

Nach Abnahme der Zellüberstände wurden in jede Vertiefung 250 µl RPMI^{sup} und 25 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS^{def}; Sigma, Deisenhofen) pipettiert.

Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt und der gebildete Farbstoff mit 250 µl Lysepuffer (1 M HCl/Isopropanol 1:25 v/v) herausgelöst. Je 100 µl dieser Lösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen (Mikrotiterplattenphotometer MR 7000; Dynatech, Denkendorf).

2.2.9. LDH-Nachweis

Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des CytoTox96® Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Mannheim).

50 µl Zellüberstand wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 50 µl Substratmix vermischt. Die Platte wurde im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 50 µl Stopplösung zugegeben und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

2.2.10. Nachweis von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch die Annexin-Fluoreszein-Methode

In der Frühphase der Apoptose zeigen sich Membranveränderungen dergestalt, daß eine Translokation von Phosphatidylserin vom inneren Teil der Zellmembran an die Zelloberfläche stattfindet. Der Nachweis von Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran apoptotischer Zellen erfolgt über das phospholipidbindende Protein Annexin, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. Annexin ist in diesem System an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Da nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Phosphatidylserin an der Oberfläche

aufweisen, müssen diese von den apoptotischen Zellen abgegrenzt werden. Eine simultane DNA-Färbung mit Propidiumjodid ist nur bei nekrotischen Zellen positiv und somit eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich.

Zum Nachweis wurden U1752- und A549-Zellen in gekammerte Objektträger (Nunc) ausgesät und infiziert. Nach 24 Stunden p.i. wurden die Zellen gewaschen und unfixiert simultan mit Annexin-V-Fluos (Boehringer Mannheim) und Propidiumjodid laut Angabe des Herstellers gefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DMR).

2.2.11. Nachweis von DNA-Leitern in apoptotischen Zellen

Es wurde der Apoptotic DNA Ladder Kit (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.12. Messung des durch MIF ausgelösten Calcium-Einstroms in Stromazellen der Ratte

Stromazellen der Ratte, die aus der Prostata isoliert worden waren, wurden 3 Tage in 6-Well-Platten auf sterilen Deckgläschen unter normalen Bedingungen kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen für 2 Stunden bei 37°C in HBSS-Inkubationspuffer (HEPES buffered saline solution), der 3 µM des FURA 2/M Fluoreszenzfarbstoffs (1 mM Stammlösung in DMSO, Sigma) enthielt, inkubiert (Glaum et al., 1989). Die Überstände wurden dann entfernt und die Zellen in normalem HBSS-Puffer für 30 min bei 37°C gehalten. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden nun in die Meßkammer gebracht und mit 500 µl HBSS-Puffer bedeckt (Wennemuth et al., 1998). Vor der Stimulation

wurden die Zellen 10 min lang beobachtet, um spontane Calciumeinströme ausschließen zu können. Die Stimulation wurde mit 50 ng rekombinanten MIF, welches in 500 µl HBSS-Puffer aufgenommen worden war, durchgeführt, oder es wurden konditionierte Zellüberstände aus den Versuchen eingesetzt (mock-infizierte und A/PR/8/34-infizierte Zellen A549 und U1752). Die Calciumströme wurden mittels computergesteuertem Fluoreszenz-Multiplier-System (DeltaScan-System/PTI, Wedel) gemessen und die Intensitäten als Ratio 340/380 nm aufgenommen. Puffer, der kein MIF enthielt, diente als Negativkontrolle. 4-bromo-calciumionophor A-23187 (10^{-5} M; Sigma, Deisenhofen) wurde als positive Kontrolle eingesetzt, um die Integrität der benutzten Zellen zu beweisen.

2.2.13. ELISA-Technik (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Die durchgeführten ELISAs beruhen auf dem Prinzip der Sandwich-Technik. Hierzu wird ein Antikörper, der gegen die zu testende Substanz gerichtet ist, an eine feste Phase (Kunststoffoberfläche) gekoppelt. An diesen Antikörper bindet das zu quantifizierende Molekül aus der Probe. Ein zweiter biotinylierter Antikörper bindet an spezifische Determinanten des Analyten und komplementiert somit das Sandwich. Die MCP-1, MIP-1 α , MIP 1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α -ELISAs funktionierten mit einem biotinylierten 2. Antikörper und Zugabe eines Streptavidin-POD-Komplexes. Im Gegensatz dazu wurden bei den IL-8, GRO- α , RANTES und IL-1 β -ELISAs POD-gekoppelte 3. Antikörper eingesetzt, die eine antigene Determinante des zweiten Antikörpers erkennen. Die durch das Enzym Peroxidase umgesetzte Substratmenge ist direkt proportional der Konzentration des gesuchten Analyten.

Als Substrat für die Peroxidase wurde 1,2-o-Phenyldiamin (OPD) eingesetzt.

Die Farbreaktion wurde nach 5-10 Minuten mit 25 µl 2,5M H₂SO₄ (Merck) gestoppt; die Messung erfolgte bei 490 nm. Die aktuellen Konzentrationen

wurden durch eine Standardreihe mit Hilfe eines geräteinternen Auswertungsprogramms (Advanced Program, Version 3.1) des Photometers berechnet.

Für die Durchführung der ELISAs wurden folgende Lösungen benutzt:

- 1) Beschichtungspuffer: PBS^{def}
- 2) Waschpuffer: PBS^{def} + 0,05% Tween 20
- 3) Block- und Probenverdünnungspuffer: PBS^{def} + 0,05% Tween 20 + 2% BSA

2.2.13.1. MIF-ELISA

- | | |
|----------------|---|
| 1. Antikörper: | Maus anti-Human MIF (0,5 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer |
| 2. Antikörper: | Ziege anti-Human MIF, Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml; R&D) |
| POD-Konjugat: | Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500U/ml; Boehringer Mannheim);
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer |
| Standard: | rekombinantes humanes MIF (R&D)
Konzentrationsbereich 400 pg/ml bis 25 ng/ml |

2.2.13.2. IL-8-ELISA

- | | |
|----------------|--|
| 1. Antikörper: | Maus anti-Human IL-8 (0,5 mg/ml; Innogenetics)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer |
| 2. Antikörper: | Kaninchen anti-Human IL-8 (1 mg/ml; Innogenetics)
Verdünnung 1:800 in Probenverdünnungspuffer |
| 3. Antikörper: | Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml; Dianova) |

Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes IL-8 (IC Chemikalien)

Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.2.13.3. GRO- α -ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human GRO- α (0,5 mg/ml; Sigma)

Verdünnung 1:250 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Ziege anti-Human (1 mg/ml; R&D)

Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer

3. Antikörper: Esel anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml, Dianova)

Verdünnung 1: 5000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes GRO- α (R&D)

Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.2.13.4. MCP-1 ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human MCP-1 (0,5 mg/ml; PharMingen)

Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Kaninchen anti-Human MCP-1 (0,5 mg/ml; PharMingen)

Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim) ; Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes MCP-1 (IC Chemikalien)

Konzentrationsbereich 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.2.13.5. MIP-1 α -ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human MIP-1 α (R&D)
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Ziege anti-Human MIP-1 α , Biotin-konjugiert (50 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:625 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim) ; Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes MIP-1 α (IC Chemikalien)
Konzentrationsbereich 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.2.13.6. RANTES-ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human RANTES (1 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Ziege anti-Human RANTES (1 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer
3. Antikörper: Esel-anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml; Dianova)
- Standard: rekombinantes humanes RANTES (IC Chemikalien)
Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.2.13.7. IL-1 β ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human IL-1 β (0,5 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Ziege anti-Human IL-1 β (1 mg/ml; R&D)
Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer
3. Antikörper: Esel-anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml; Dianova)
- Standard: rekombinantes humanes IL-1 β (R&D)
Konzentrationsbereich 40 pg/ml bis 2,5 ng/ml

2.2.13.8. IL-6-ELISA

1. Antikörper: Ratte anti-Human IL-6 (0,5 mg/ml; PharMingen)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Ratte anti-Human IL-6, Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml; PharMingen)
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim) ; Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes IL-6 (PBH)
Konzentrationsbereich 150 pg/ml bis 10 ng/ml

2.2.13.9. IL-10-ELISA

1. Antikörper: Ratte anti-Human IL-10 (0,5 mg/ml; PharMingen)
2. Antikörper: Ratte anti-Human IL-10, Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml;

PharMingen)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim) ; Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes IL-10 (PharMingen)
Konzentrationsbereich 15 pg/ml bis 1 ng/ml

2.2.13.10. TNF- α -ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human TNF- α (1mg/ml; Knoll)
Verdünnung 1:200 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Maus anti-Human (0,5 mg/ml; PharMingen), Biotin-konjugiert

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim) ; Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes TNF- α (PharMingen)
Konzentrationsbereich 300 pg/ml bis 20 ng/ml

2.2.13.11. Interferon- α - und Interferon- β -ELISA

Es wurden kommerzielle Kits der Firma Biosource (Camarillo, USA) benutzt und die Zellkultur-Überstände unverdünnt im Test eingesetzt.

2.2.14. Immunhistochemie

2.2.14.1. MIF-Darstellung (ABC-Methode)

Antikörper

anti-human-MIF (Maus) 1:1000 in PBS/BSA/Avidin

anti-Maus-IgG, Biotin-konjugiert Vector Laboratories

Reagenzien:

PBS^{def}

TBS-Puffer 6,05 g Tris, 9 g NaCl in A.dest, pH7,6

ABC-Kit Vectastain Elite
Vector Laboratories

Diaminobenzidin (DAB)	50 mg in 50 ml Tris/HCl
	0,05 molar,
	50 µl H ₂ O ₂ Sigma, Deisenhofen

Die intrazelluläre Darstellung von MIF erfolgte mit Hilfe eines indirekten Immunoperoxidase-Verfahrens. Der erste AK ist spezifisch gegen eine Antigen determinante des nachzuweisenden MIF gerichtet und wird mit einem zweiten, biotilyierten Ig-Antikörper markiert. Die entsprechenden Antigen/Antikörper-Komplexe konnten mittels der ABC-Technik (Avidin-Biotin-Complex-Methode) detektiert werden (Bonnard et al, 1984; Wilchek et al 1984; Hsu et al 1981). Bei dieser Technik macht man sich die außergewöhnlich hohe Affinität (10^{-15} M) des Avidins zu dem Vitamin Biotin zunutze. Die Bindung ist praktisch irreversibel und aufgrund der vier potentiellen Biotin-Bindungsstellen des Avidinmoleküls kann eine Verstärkung des Signals erreicht werden. Der zweite AK ist durch seine Biotinmarkierung in der Lage, präformierte Avidin-

Biotin-Enzym-Komplexe zu binden und schafft somit eine Verbindung („Brückenantikörper“) zwischen diesem Komplex und dem an das nachzuweisende MIF gebundenen 1. AK. Da in der folgenden Reaktion das Substrat DAB von der Peroxidase in einen unlöslichen Farbstoff umgesetzt wird, lässt sich MIF in der Zelle lokalisieren.

Paraffinschnitte der humanen Lunge wurden nach Entparaffinierung durch Xylol und Hydratisierung über die absteigende Alkoholreihe mit 3% H₂O₂ in Methanol behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren [30 min bei Zimmertemperatur (ZT)]. Um die Antigene freizulegen, wurden die Schnitte einer Mikrowellenbehandlung in 0,1 molarem Citratpuffer unterzogen (3x5 min/600 W), kurz in TBS gewaschen und mit 0,001% Trypsin behandelt (15 min bei 37°C). Die Schnitte wurden mit A. dest gespült und dann der Färbung mittels ABC-Kit (Vector Laboratories) unterzogen. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.2.14.2. Immunhistochemischer Nachweis von regulatorischen Proteinen in der Apoptose (bcl-2, bcl-X-L, bcl-X-S)

Entsprechend der obenstehenden Methode wurden in gekammerten Objektträgern gewachsene Lungenepithelien auf die Expression von regulatorischen Proteinen der Apoptose untersucht.

Antikörper:

Monoklonaler Maus Anti-Bcl-2-Antikörper (Dako)

Polyklonaler Kaninchen Anti-Bcl-X-Antikörper (PharMingen)

Polyklonaler Kaninchen Anti-Bcl-X_L-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology)

Auf gekammerten Kunststoffobjektträgern (Chamberslide; Nunc) gewachsene Lungenepithelien (25.000 Zellen/Kammer) wurden dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, mit 2 MOI Influenza A-Virus in 100 µl Medium infiziert und 1 h bei

37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Medium mit 1% FCS wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden nichtinfizierte Kontrollzellen mitgeführt. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden die Überstände abgenommen, die Präparate luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des ABC-Vectastain-Kits (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 100 µl 4%-igem Formaldehyd in PBS^{def} bei 4°C. Danach wurden die Zellmembranen durch Inkubation mit 100%-igem Ethanol für 10 min permeabilisiert. Nach Waschen der Objektträger in PBS^{def} wurde der 1. AK inkubiert. Dafür wurden 100 µl des 1:40 in PBS^{def} + 1% BSA + 0,00033% Avidin + 0,1% Natriumazid verdünnten AKs in die entsprechende Kammer pipettiert. Das zugesetzte Natriumazid inhibiert zelluläre Peroxidasen, auf den Zellen vorhandenes Biotin wird durch das zugegebene Avidin blockiert. Nach 1 h Inkubation bei ZT wurde nach zweimaligem Waschen der 2. AK für 30 min bei ZT inkubiert. Dazu wurden 100 µl des 1:400 in PBS^{def} + 0,002% Biotin + 5% Pferdeserum verdünnten Antikörpers pipettiert. Das freie Biotin dient zur Absättigung von Bindungsstellen am Streptavidin, welches während des ersten Inkubationsschrittes zum Blockieren von zellulärem Biotin zugesetzt worden war. Überschüssiger AK wurde durch Waschen in PBS^{def} entfernt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem präformierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Ansatz nach Angabe des Herstellers) für 30 min bei ZT. Nach einem Waschschrift mit TBS-Puffer wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des Peroxidase-Substrates DAB gestartet (100 µl/Kammer). Die auftretende Farbreaktion wurde nach 5-8 min durch Spülen in H₂O gestoppt. Die Präparate wurden mit phosphatgepuffertem Glycerin eingedeckt.

2.2.15. Darstellung von MIF mittels Immunfluoreszenzfärbung

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| 1. AK: anti-human-MIF (Maus) | 1:100 in PBS/BSA |
| 2. AK: anti-mouse IgG (FITC-markiert) | 1:50 in PBS/BSA (PharMingen) |

NHBE-Zellen wurden in gekammerte Objektträger (Nunc) ausgesät und über Nacht in Medium bei 37°C, 5% CO₂ gehalten. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion in der üblichen Weise; die Zellen inkubierten 24 Stunden in Medium. Das Medium wurde durch Waschen in PBS⁺⁺ entfernt und die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (in PBS^{def}) für 10 min bei 4°C fixiert, die Zellen anschließend mit 100%igem Ethanol für 10 min permeabilisiert und die Objektträger in PBS gewaschen. Der 1. Antikörper wurde 1 Stunde bei ZT inkubiert, der Überschuß durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Ein Feld wurde zur Kontrolle des 2. Antikörpers mit PBS inkubiert. Im Anschluß folgte die Detektion des gebundenen anti-MIF-Antikörpers über das FITC-markierte anti-Maus-IgG (1 Stunde bei ZT). Nach Waschen in PBS wurde das Präparat mit phosphatgepuffertem Glycerin eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

2.2.16. RNA-Isolierung

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert und bei -80°C gelagert.

Für die RNA-Präparation wurden die Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen mit einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Ansatz durchgeführt. Die Infektion der Zellen erfolgte in Analogie wie unter 2.2.1. beschrieben. Die Zellen jeder Petrischale wurden mit 2 ml Trizol-Reagenz versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Das Zellysate wurde mit Hilfe von Gummischabern aus den Gewebekulturschalen abgelöst und zum Scheren der DNA mehrfach durch eine Kanüle (24g) aufgezogen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Die isolierte RNA wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und vermessen. Dazu wurden die Proben (je 1 µl) mit 750 µl A.dest. verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (Gilford Response IITM UV-Vis Spectrophotometer). Die Konzentration (C) der in der Probe enthaltenen RNA läßt sich durch folgende Formel errechnen:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260} \times U \times V$$

U = Umrechnungsfaktor (40 für RNA, 50 für DNA)

V = Verdünnungsfaktor (750)

Die RNA-Lösungen wurden auf 2 µg/µl eingestellt und bei -80°C gelagert.

2.2.17. cDNA-Synthese

Das Enzym *Reverse Transkriptase* schreibt RNA in DNA um, Oligo-dT wurde als Primer benutzt.

Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in 12 µl Aqua dest. aufgenommen und mit 1 µl Oligo-dT19-24 (Amersham, Freiburg) für 10 min bei 70°C erhitzt. Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA werden dabei gelöst und die Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Region der mRNA angelagert. Die Proben wurden sofort auf Eis gelagert, mit 4 µl Reaktionspuffer (5x; Gibco), 2 µl 0,1M DTT (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe), 1 µl 10mM dNTP-Mix (Promega, Mannheim) und 1 µl SuperScript™ (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation der Proben bei 94°C 10 min denaturiert.

2.2.18. Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses in-vitro-Verfahren wird zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren verwendet. Man nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen zu können, wenn ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich zur

Verfügung steht. Dazu wird die denaturierte DNA, die eine zu amplifizierende Sequenz erhält, mit einem Überschuß von zwei flankierenden, chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) inkubiert. Durch diese Hybridisierung entstehen kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte, die als Startpunkte für die DNA-Polymerase dienen, die nun die DNA-Abschnitte zum Doppelstrang ergänzt, die zwischen den Primern liegen. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Polymerisation kommt es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der vorliegenden DNA-Fragmente. Diese Kettenreaktion führt zu einer exponentiell ansteigenden, selektiven Vermehrung der durch die Primer flankierten DNA-Sequenz. Die Primer-Anlagerung kann spezifisch nur bei hohen Temperaturen erfolgen, so daß eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt wird. Diese Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 70°C und ist auch für kurze Zeit bei 95°C stabil.

2.2.18.1. Primerauswahl

Die DNA-Sequenzen der jeweiligen Gene wurden in der Datenbank der „European Molecular Biology Organization“ (EMBO; Heidelberg) gezogen.

<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>
MIF	5'-TCCTTCTGCCATGCCGA-3' 5'-TGCGGCTCTTAGGCGAAGGT-3' Fragmentlänge: 370 Bp
Interleukin-8	5'-TTCTGCAGCTCTGTGTGAAGGTG-3' 5'-AAGGATCCTGGCTAGCAGACTAG-3' Fragmentlänge: 710 Bp

RANTES	5'-GATGTACTCCCGAACCCA-3' 5'-TCCCCATATTCCTCGGAC-3' Fragmentlänge: 235 Bp
Gro-α	5'-AACTGCGCTGCCAGTGCTTGC-3' 5'-TTGGATCCAGGTGGCCTCTGC-3' Fragmentlänge: 313 Bp
GAPDH	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3' 5'-GCTATACCAGGAAATGAGCTT-3' Fragmentlänge: 300 Bp
Nukleoprotein	5'-TGGCGTCCCAAGGCACATCCTGGG-3' 5'-CATCAGAGAGCACATCCTGGG-3' Fragmentlänge: 500 Bp
M-Protein	5'-CCGTCAGGCCCCCTCAAAGC-3' 5'-GCATCCACAGCACTCTGCTG-3' Fragmentlänge: 860 Bp
MxA	5'-TGCATCGACCTCATTGACTC-3' 5'-TCTCAATCTCGTAGTCCTGG-3' Fragmentlänge: 244 Bp

Die o.g. Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG-Biotech GmbH, Ebersberg) synthetisiert. Die Primer wurden mit einer Konzentration von 50 pM in die PCR eingesetzt.

Die beiden unten angeführten Primerpaare wurden gebrauchsfertig bei Biosource (Camarillo, USA) bezogen:

MCP-1	Biosource;	Fragmentlänge: 279 Bp
MIP-1α	Biosource;	Fragmentlänge: 279 Bp

2.2.18.2. Amplifizierungsreaktion

Die PCR wurde in 500 µl Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zu 1 µl der cDNA wurden je 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer (Perkin Elmer), 0,2 µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), sense- und antisense Primer (50 pM) zugesetzt und auf ein Endvolumen von 50 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Touch down Hybrid Thermocycler durchgeführt. Die PCR- Bedingungen sind der nachfolgenden Übersicht zu entnehmen.

<u>Gen</u>	<u>Denaturierung</u>	<u>Hybridisierung</u>	<u>Polymerisation</u>	<u>Zyklen</u>
Influenza A	5 min 95°C			1
-NP	1 min 95°C	1 min 65°C	1 min 72 °C	35
			5 min 72°C	1
Influenza A	5 min 95°C			1
-M-Protein	1 min 95°C	1 min 65°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1
GAPDH	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 62 °C	1 min 72 °C	25
			5 min 72°C	1
MIF	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 60°C	1 min 72°C	27
			5 min 72°C	1
IL-8	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 62°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1

GRO-α	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 62°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1
RANTES	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 62°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1
MIP-1α	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 55°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1
MCP-1	5 min 95°C			1
	1 min 95°C	1 min 60°C	1 min 72°C	35
			5 min 72°C	1

2.2.18.3. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die PCR-Fragmente wurden in 1,5%-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (horizontal system for submerged electrophoresis, BRL, USA). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer eingesetzt.

10 μ l des jeweiligen PCR-Produkts wurden mit 2 μ l 6x DNA-Ladepuffer versetzt, 2 μ l 100 Bp-Marker (Pharmacia) auf 10 μ l mit Aqua dest. aufgefüllt. Jeweils 10 μ l der Probe wurde in die Geltasche aufgetragen und bei 110 Volt in 1,3 Stunden aufgetrennt.

Das Gel wurde anschließend für 20 min in Ethidiumbromid gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Photographieren der Gele erfolgte mit einem computergestützten Aufnahmesystem (Vilber Lourmat; Fröbel Labortechnik, Wasserburg).

TAE-Puffer:

- 0,04 M Tris-Acetat
- 0,001 M EDTA
- 1,1 ml Eisessig
- ad 1000 ml A. dest.

Ethidiumbromid:	50 µl Ethidiumbromid ad 100 ml A. dest.
DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyarol gelöst in 30% Glycerin

2.2.19. Northern Blot

2.2.19.1. Präparation von RNA

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert und bei -80°C gelagert.

Siehe auch 2.2.16 (S. 49).

2.2.19.2. Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Es wurden denaturierende Formaldehyd-haltige Agarosegele benutzt, um bei geringem Probenvolumen einen maximalen RNA-Gehalt zu erhalten. Diese Methode geht auf Lehrbach et al. (1977), Goldberg (1980) und Seed zurück.

Die drei nach Detektion mit Ethidiumbromid sichtbaren Banden repräsentieren die 28S-, 18S- und 5S-rRNA. Sie geben Aufschluß über die Integrität der RNA und sind Kontrolle über die Einstellung der RNA-Konzentration.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden folgende Lösungen benötigt:

1. MOPS-Puffer (10x):	200mM 4-Morpholino-	ICN, Meckenheim
	propansulfonsäure,	
	50 mM Natriumacetat	Merck, Darmstadt
	10 mM EDTA (Na ₂ -Salz)	Merck, Darmstadt

2. Probenpuffer (5x)	750 µl Formamid (deionisiert)	ICN, Meckenheim
	150 µl 10x MOPS-Puffer	
	240 µl Formaldehyd, 37%ig	Merck, Darmstadt
	100µl Glycerin	Serva, Heidelberg
	80 µl 1% Bromphenolblau	Sigma,Deisenhofen
	180 µl H ₂ O	
1. Laufpuffer:	1x MOPS-Puffer	
2. Färbelösung:	0,2% Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
	in 0,1 M Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt

Vor Benutzung müssen die Elektrophoresekammer, Schlitten und Kämme für 1 Stunde in 3% igem H₂O₂ sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen werden. Für die Herstellung von 100 ml Gelvolumen wurde 1 g Agarose (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) eingewogen und in 1x MOPS-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 60°C wurden 5 ml 37%iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) unter Schütteln zugegeben und das Gel gegossen.

Der RNA-Ansatz pro Spur wurde folgendermaßen aufgetragen:

2,5 µl Probenpuffer (5x)

10 µl RNA (2µg Gesamt-RNA, in H₂O verdünnt)

Zur Denaturierung basengepaarter Nukleotidabschnitten wurden die RNA-Proben 10 min bei 65°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Der Laufpuffer wurde zunächst nur so hoch eingefüllt, daß er das Gel nicht überspülte. Jeweils 10 µl wurden pro Spur beladen. Damit die Proben ins Gel einlaufen konnten, wurde die Elektrophorese mit 100 mA gestartet, dann die Kammer mit

Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese mit 4V/cm Elektrodenabstand fortgesetzt.

Nach dem Gellauf wurde das Gel dreimal für 20 min unter Schütteln gewässert, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen.

2.2.19.3. Blotting

Der Northern Blot ist eine Methode zur vertikalen Übertragung von RNA aus einem Gel auf eine Membran, wo sie schließlich mit komplementären Nukleinsäure-Sonden hybridisieren kann. Bei der Kapillar-Transfer-Methode wandert die RNA aufgrund von Kapillarkräften mit dem Flüssigkeitsstrom aus dem Gel heraus und lagert sich auf der Membran ab (Thomas, 1980; Wahl et al., 1987). Die relativen Positionen der RNA-Banden werden während des Transfers auf die Matrix beibehalten. Somit läßt sich die RNA quantitativ, qualitativ und in ihrer Länge analysieren.

Folgender Transferpuffer wurde verwendet:

20x SSC, pH 7:	3M NaCl	Roth, Karlsruhe
	300 mM Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe

Das gewässerte Gel equilibrierte 15 min in 20x SSC. Die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) wurde nach 5-minütiger Wässerung in 20x SSC (10 min) geschüttelt. Auf eine ins Pufferreservoir aus 20x SSC eintauchende feste Unterlage wurden vier mit 20x SSC befeuchtete Lagen Whatman-Papier (Schleicher und Schüll) in Gelgröße gelegt. Darüber folgte eine Brücke, bei der die Enden ins Reservoir hineinreichten. Nachdem auf die Brücke wiederum mit 20x SSC getränkte Whatman-Papiere in Gelgröße gelegt worden waren, wurde auf diesen Stapel das Gel (Rückseite nach oben) positioniert und luftblasenfrei mit der equilibrierten Membran bedeckt. Um einen „Kurzschluß-Kontakt“ zwischen den ober- und unterhalb des Geles befindlichen Filterpapieren zu vermeiden, wurden die Gelränder mit breiten

Parafilm-Streifen ausgelegt. Auf die Membran wurde ein 10 cm hoher Stapel aus trockenen Papiertüchern gelegt, der wiederum mit einer Metallplatte und 1 kg Gewicht beschwert wurde. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde zunächst luftgetrocknet, dann mit der RNA-tragenden Seite einer UV-Strahlung (254 nm) von 1,23 J/cm² ausgesetzt (Fluo-Link; Biometra, Göttingen). Die Lagerung der Membran erfolgte kurzfristig bei 4°C:

2.2.19.4. Nicht radioaktive Hybridisierung

Hybridisierung bezeichnet allgemein die Bildung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Basenpaarung aus zwei vollständig getrennt vorliegenden Einzelsträngen. Stringente Bedingungen gewährleisten eine fehlerlose Basenpaarung zwischen den hybridisierenden Einzelsträngen (McGinnis et al., 1984; Wahl et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Hybridisierung der Northern Blot-Membranen Antisense RNA-Sonden benutzt, da RNA/RNA-Hybride stabiler als RNA/DNA-Hybride sind (Bodkin und Knudson, 1985), so daß eine höhere Stringenz und damit höhere Spezifität erreicht werden kann.

Für die Hybridisierungsreaktion wurden folgende Lösungen benutzt:

- | | | |
|--------------------------|---|-------------------|
| 1) 20x SSC, pH 7 | | s.u. 2.2.19.3. |
| 2) Maleinsäurepuffer | 100 mM Maleinsäure | Merck-Schuchardt, |
| | pH 7,5 | Hohenbrunn |
| | 150 mM NaCl | Roth, Karlsruhe |
| 3) Blockierungspuffer | 10% Blockierungsreagenz | Boehringer, |
| (10x) | in Maleinsäurepuffer | Mannheim |
| 4) Hybridisierungslösung | | |
| | 5x SSC mit 2% (w/v) Blockierungsreagenz | Boehringer, |
| | | Mannheim |
| | 50% (v/v) Formamid | ICN; Meckenheim |

0,1% (w/v) N-Laurylsarkosin	Sigma, Deisenhofen
0,02% (w/v) SDS	Serva, Heidelberg
100 µg/µl denaturierte Salm-DNA	Sigma, Deisenhofen
5) Waschlösung 1: 2x SSC mit 0,1% SDS	Serva, Heidelberg
6) Waschlösung 2: 0,1x SSC mit 0,1% SDS	Serva, Heidelberg

Die Nylonmembran mit der kovalent gebundenen RNA wurde 5 min in 0,04 N NaOH inkubiert und zweimal in 2x SSC gewaschen. Zusammen mit einem Kunststoffnetz als Abstandhalter zum Flaschenglas wurde sie in Hybridisierungsflaschen (Biometra Göttingen) eingerollt. Die Prähybridisierung und die Hybridisierungen erfolgten in diesen Flaschen im Hybridisierungssofen (Hybaid; Biometra, Göttingen) unter ständiger Rotation. Zur Prähybridisierung inkubierte die Membran zwei Stunden bei 68°C in der Hybridisierungslösung. Diese wurde dann verworfen und durch in Vorversuchen präabsorbierte DIG-markierte RNA-Sonde (50 ng/ml) in Hybridisierungslösung ersetzt. Diese Lösung war mehrfach verwendbar und konnte bei -20°C gelagert werden. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt über Nacht unter hoch-stringenten Bedingungen bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 5 min in Waschpuffer 1 und zweimal 15 min in Waschpuffer 2 bei je 68°C gewaschen. (Lagerungsmöglichkeit der Membran bei -20°C)

2.2.19.5. Detektion der hybridisierten RNA

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wird ein an alkalische Phosphatase gekoppelter anti-DIG-Antikörper an die DIG-markierte RNA-Sonde auf der Nylonmembran gebunden. Die Sichtbarmachung der Komplexe wird durch Zugabe eines Chemoluminiszenz-Substrates (CPD-Star, Tropix; Boehringer Ingelheim) ermöglicht, welches durch die Antikörper-gekoppelte

Phosphatase umgesetzt wird. Das Substrat wird nach enzymatischer Dephosphorylierung instabil und zerfällt unter Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann (Höltke et al., 1992; Dubitsky et al., 1992; Vaillancourt et al., 1992). Die Intensität der Lichtemission ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Enzyms und somit zu auf der Membran gebundenen spezifischen RNA-Menge.

Folgende Reagenzien wurden benötigt:

1) Waschpuffer, pH 7,5	100 mM Maleinsäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
	150 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
	0,3% Tween 20	Serva, Heidelberg
2) Reaktionspuffer, pH 9,5	100 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
	100 mM Tris-HCl	Serva, Heidelberg
	50 mM MgCl ₂	Merck, Darmstadt
3) Blockierungspuffer	siehe unter 2.2.18.4.	
4) anti-DIG-AP-Konjugat	polyklonale Schaf-anti-DIG-Fab-Fragmente, konjugiert an alkalische Phosphatase (750 U/ml)	
	Boehringer, Mannheim	

Die hybridisierte Membran wurde 5 min im Waschpuffer equilibriert und für 45 min in 1%igem Blockierungspuffer geschüttelt. Das anti-DIG-AP-Konjugat wurde 1:1500 in 1% Blockierungspuffer verdünnt und die Membran 45 min in dieser Antikörperlösung inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte (je 10 min) in Waschpuffer. Die Membran wurde für 5 min in Reaktionspuffer equilibriert, dann für 5 min mit dem Substrat CPD-Star bedeckt (Substrat mehrfach verwendbar; Lagerung dunkel bei 4°C) und feucht in einer Kunststoff-

Folie eingeschweißt. Um ein möglichst hintergrundarmes Ergebnis zu erzielen, wurde die Membran für 10 min bei 37°C inkubiert; dabei stellt sich ein Gleichgewicht bei der Chemoluminiszenz-Reaktion ein. Die Membran wurde einem Röntgenfilm exponiert, wobei die Expositionszeiten 5 Sekunden bis 10 Minuten betragen können. Die Filmentwicklung erfolgte mit Chemikalien der Agfa-Gefaert AG, Leverkusen (Entwickler G 152; Fixierer G 354).

2.2.20. Calcium-Influx Assay

Rattenstromazellen wurden während drei Tagen in Platten mit 6 Vertiefungen auf Deckgläschen in Medium bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen 2 Stunden bei 37°C in HBSS-Inkubationspuffer, der 3 µM des Fluoreszenzfarbstoffs FURA 2/AM enthielt (1mM Stock-Lösung in DMSO), inkubiert (Glaum et al., 1989). Die Überstände wurden anschließend entfernt und die Zellen in normalem HBSS-Puffer 30 Minuten lang bei 37°C gehalten. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden in die Meßkammer überführt und mit 500 µl HBSS-Puffer bedeckt (Wennemuth et al., 1998). Vor der Stimulation wurden die Zellen 10 Minuten lang beobachtet, um spontanen Calciuminflux ausschließen zu können. Die Stimulation wurde in 500 µl HBSS-Puffer mit 50 ng rekombinantem MIF oder Zellkulturüberstand durchgeführt. Der Calcium-Influx wurde mit einem computergesteuerten Zellfluoreszenz-Photomultiplier-System aufgezeichnet (DeltaScan-System/PTI, Wedel) und die Intensitäten als Ratio von 349/380 nm aufgenommen. Puffer ohne MIF diente als Negativkontrolle, 4-bromo-Calciumionophor A-23187 (10^{-5} M, Sigma, Deisenhofen) als Positivkontrolle, um die Reaktionsfähigkeit der Zellen zu überprüfen.

2.2.21. Immunpräzipitation

Die Induktion eines Calciuminfluxes in Rattenstromazellen durch rekombinantes MIF und Zellüberstände von infizierten Lungenepithelzellen wurde durch einen spezifischen MIF-Antikörper (mAB XIV, Maus) und nachfolgende Immunpräzipitation mit Protein G (Sigma, Deisenhofen) blockiert.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologie der Lungenepithelzellen nach Influenza A-Virusinfektion.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl alveoläre als auch bronchioläre, adhärent wachsende Lungenepithelien als Target-Zellen für eine Infektion mit Influenza A-Virus eingesetzt. Zum einen wurden humane Zelllinien infiziert; dabei handelte es sich um die alveoläre Linie A549 und die bronchioläre Linie U1752. Zum anderen wurden primäre humane bronchioläre Epithelzellen mit Influenza A-Virus infiziert.

Das im Abschnitt Material und Methoden beschriebene humanpathogene Influenza A-Virus A/PR/8/34 wurde in den Versuchen mit 2 MOI eingesetzt.

Mit Influenza A-Viren infizierte alveoläre (A549) und bronchioläre Lungenepithelzellen (U1752), als auch primäre bronchioläre Epithelzellen zeigten ausgeprägte zytopathische Effekte. Mikroskopisch wurde eine Abrundung der Zellen, Zellschrumpfung und eine nachlassende Fähigkeit zur Adhärenz festgestellt.

Die ausgeprägten zytopathischen Effekte sind aus Abbildung 1 und Abbildung 2 ersichtlich. Die Zellen der Linien A549 (Abb. 1A: nicht-infizierte Kontrolle; Abb. 1B: A/PR/8/34 -Infektion) und U1752 (Abb. 1C: nicht-infizierte Kontrolle; Abb. 1D: A/PR/8/34 -Infektion) zeigten schon 24 Stunden post infectionem (p.i.) eine deutliche Schädigung bis hin zur Ablösung bereits abgestorbener Zellen. Dagegen waren die zytopathischen Effekte bei primären bronchiolären Epithelien 24 Stunden post infectionem (p.i.) mit Influenza A-Viren (Abb. 2B) nur bei wenigen Zellen eingetreten, erst nach 48 Stunden p.i. war die Zellschädigung mikroskopisch deutlich ausgeprägt (Abb. 2 D). Die zugehörigen nicht-infizierten Kontrollzellen sind in Abb. 2A (24h p.i.) und Abb. 2C (48h p.i.) dargestellt.

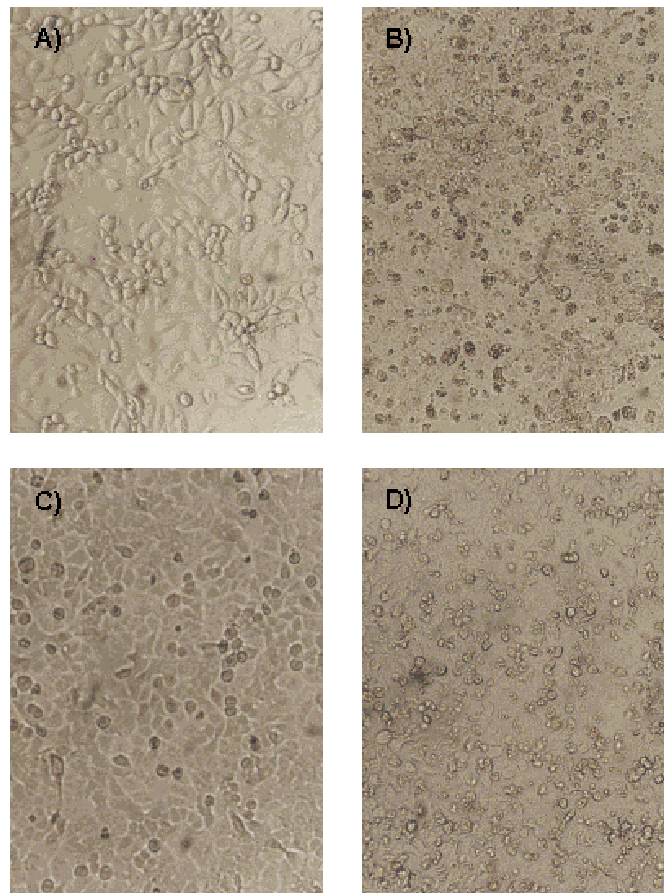


Abb. 1 zeigt die veränderte Morphologie der alveolären Zelllinie A549 (Kontrolle; Abb.1 A), die mit 2 MOI A/PR/8/34 (Abb.1B) infiziert und nach 24 Stunden lichtmikroskopisch untersucht wurden. Ebenso wurden bronchioläre Zellen der Linie U1752 infiziert und untersucht (Abb. 1C: Kontrolle; Abb. 1D: A/PR/8/34).

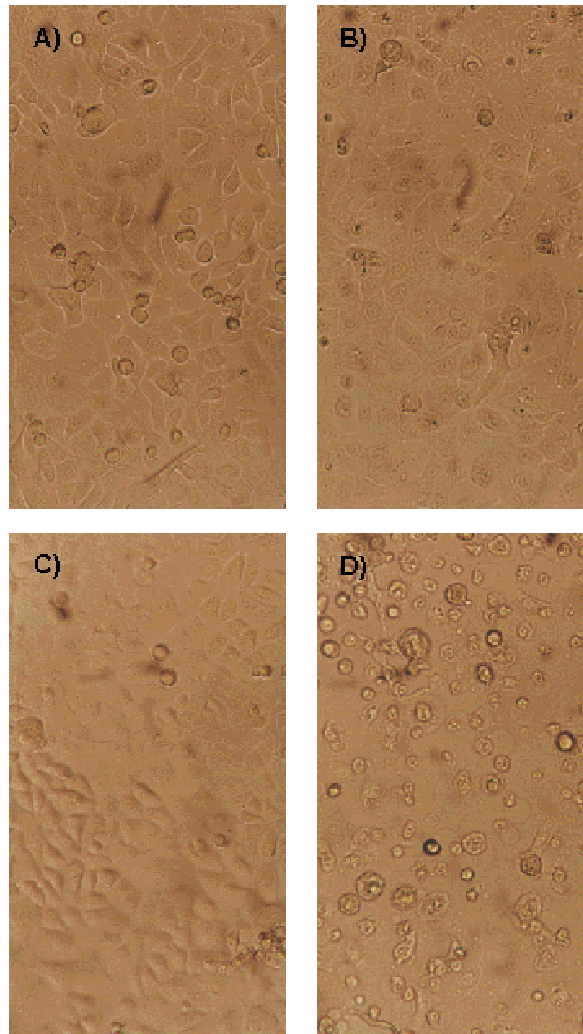


Abb. 2 zeigt die veränderte Morphologie von normalen humanen Bronchialepithelzellen 24 bzw. 48 Stunden p.i. mit Influenza A-Virus A/PR/8/34. Die Abbildungen 2A und C zeigen die mock-infizierten Zellen 24 bzw. 48 h p.i., die Abbildungen 2 B und D die infizierten Zellen nach 24 und 48 h p.i.

3.2. Vitalität der Zellen nach Influenza A-Virusinfektion

Der Vitalitätsverlust wurde auch anhand des MTT-Tests gezeigt. Kontrollzellen und infizierten Zellen wurde 24h p.i. für 4 Stunden mit dem Tetrazoliumsalz MTT in Medium inkubiert. Dieser Farbstoff wird von stoffwechselaktiven Zellen in einen

blauen Farbstoff umgesetzt; die optische Dichte dieses Farbstoffs ist dem Anteil der stoffwechselaktiven Zellen direkt proportional.

Sowohl A549-Zellen als auch U1752-Zellen zeigten einen deutlichen Abfall ihrer Stoffwechselaktivität, der bei den alveolären Zellen 24hp.i. um 20% (Abb. 3a) liegt, bei den bronchiolären Zellen sogar um 40% (Abb. 3b).

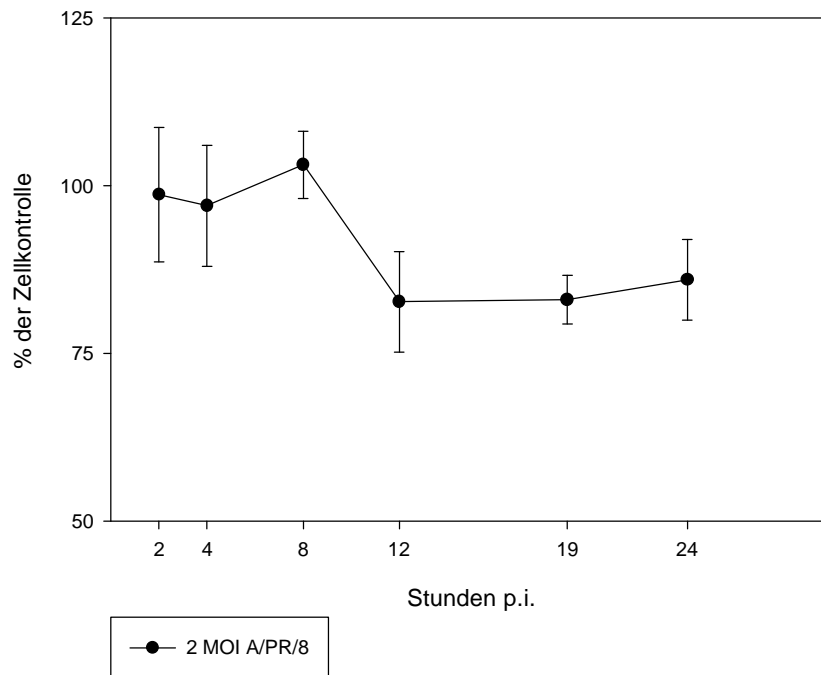


Abb.3a veranschaulicht in einem MTT-Test die Abnahme der Stoffwechselaktivität in den Zelllinien A549 im zeitlichen Verlauf bis 24 Stunden nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

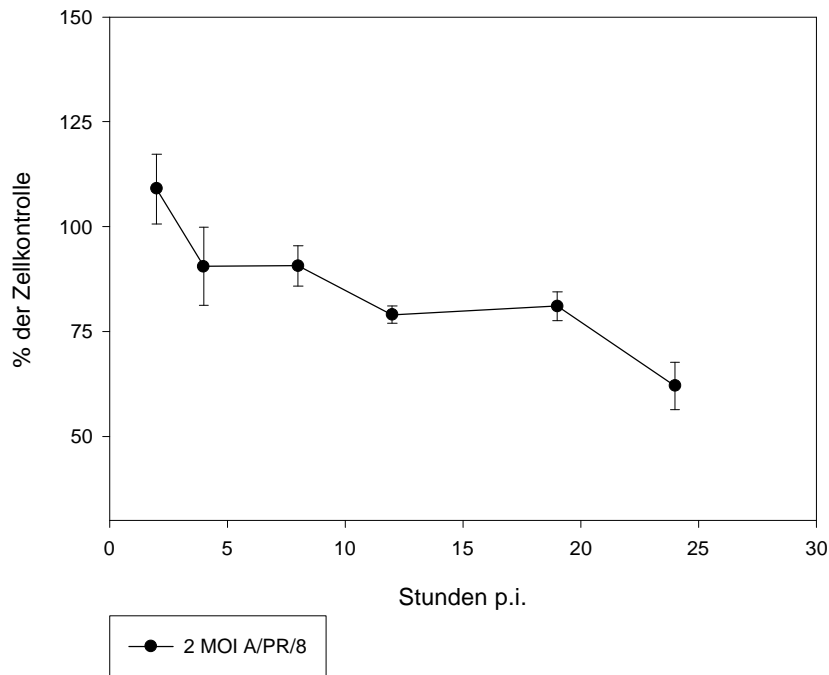


Abb.3b veranschaulicht in einem MTT-Test die Abnahme der Stoffwechselaktivität in den Zelllinien U1752 im zeitlichen Verlauf bis 24 Stunden nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

3.3. Replikation von Influenza A-Viren in humanen Lungenepithelzellen

3.3.1. Nachweis von viraler mRNA

Influenza A-Viren sind RNA-Negativ-Strang-Viren, deren Polymerasen zuerst diesen Negativ-Strang in eine Plus-Strang-mRNA umschreiben müssen. Virale Polymerasen ermöglichen durch Cap-Stealing von Cap-Strukturen am 5'-Ende wirtseigener mRNAs und das Anhängen eines Poly-A-Schwanzes über einen Slippage-Mechanismus, daß diese mRNA für die Produktion viraler Proteine dem Syntheseparat der Zelle zur Verfügung gestellt werden kann.

Diese virale mRNA kann durch eine RT-PCR mittels Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben werden. Für den Nachweis der viralen mRNA in der PCR wurden Primer für das schon früh in der Infektion synthetisierte Nucleoprotein NP und

Primer für das für die Infektiosität verantwortliche Matrixprotein M eingesetzt. Die gewählten Primer führten zu 500 bp langen Fragmenten für das Nukleoprotein und zu 860 bp langen Fragmenten für das Matrixprotein in der PCR; beide Fragmente wurden in 35 Amplifizierungszyklen hergestellt.

In den Zelllinien A549 und U1752 konnte die cDNA für das Nukleoprotein (NP-Protein) nachgewiesen werden (Abb. 4a), für die bronchioläre Linie U1752 ist außerdem die Expression der viralen mRNA für das M-Protein dargestellt (Abb. 4b). Dies läßt den Schluß zu, daß sich A/PR/8/34 in den gewählten Zelllinien vermehrt.

Der Nachweis der viralen mRNA für das Nukleoprotein in primären humanen Bronchialepithelien (NHBE) ist in Abb. 4c erbracht; hier konnte weiterhin gezeigt werden, wie auffallend lange die Transkripte nach der Infektion mit A/PR/8/34 bestehen blieben.

In den Abbildungen 4a und 4c ist die cDNA für das „housekeeping gene“ GAPDH dargestellt, welches konstitutiv exprimiert und durch die Infektion nicht beeinflusst wird.

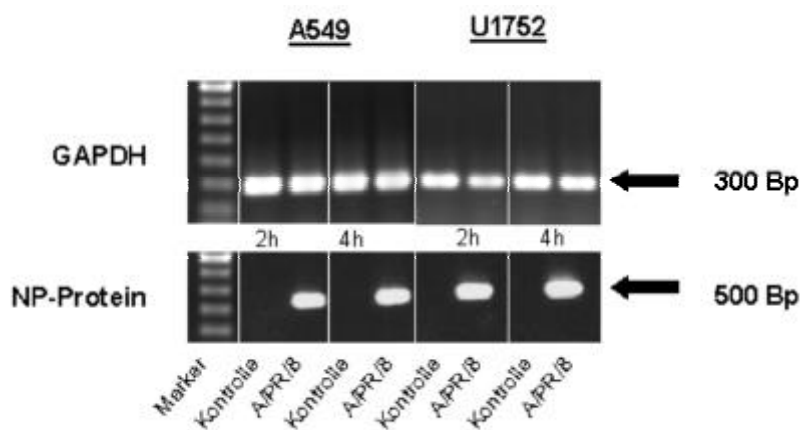


Abb. 4a zeigt den Nachweis viraler mRNA mittels RT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (2 MOI A/PR/8/34) für das Nukleoprotein NP in den Zelltypen A549 und U1759. Im Vergleich wurde die GAPDH-Kontrolle im Gel aufgetragen.

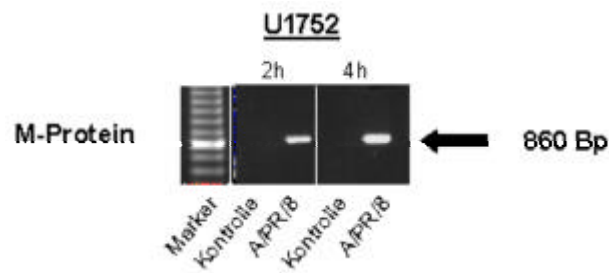


Abb. 4b zeigt beispielhaft bei U1752-Zellen die mRNA für das virale M-Protein in einer PCR nach Infektion mit A/PR/8/34 (2h p.i., 4h p.i.).

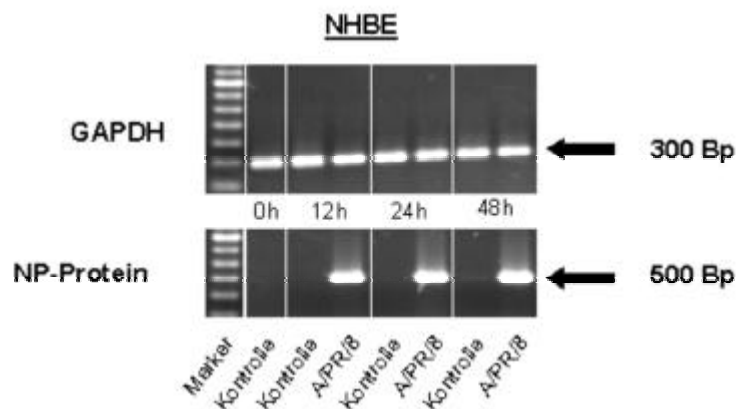


Abb.4c zeigt den Nachweis von mRNA des viralen NP-Proteins , die 2 und 4 Stunden nach Infektion mit A/PR/8/34 in primären NHBE-Zellen nachweisbar war. Im Vergleich dazu die GAPDH-Kontrolle.

3.3.2. Freisetzung infektiöser Viruspartikel

Der Nachweis freigesetzter Viruspartikel wurde im Plaque-Test erbracht. Dazu wurden Überstände von A/PR/8/34-infizierten alveolären Zellen (A549) und bronchiolären Zellen (U1752) auf MDCK-Zellen inkubiert. MDCK-Zellen zeigen 2-3 Tage später Plaquebildung, wenn im aufgetragenen Zellüberstand infektiöse Viruspartikel vorhanden sind.

In diesem Versuchsansatz wurde festgestellt, daß die im Überstand vorhandenen Viruspartikel nur nach Trypsinbehandlung in der Lage sind, eine Plaquebildung in MDCK-Zellen zu erzeugen. Influenza A-Viren sind nur dann infektiös, wenn das HA-Molekül gespalten ist. Diese Spaltung wird im infizierten Organismus durch zelluläre Proteasen (Furine) gewährleistet. Es war durchaus zu erwarten, daß die

eingesetzten Zelllinien diese für die Infektiosität benötigte Spaltung des HA-Moleküls nicht bewerkstelligen. Um die potentiell infektiösen Partikel aber doch nachweisbar zu machen, wurde die künstliche Spaltung des Hämagglutinin durch Trypsin dem Plaque-Test vorangestellt (siehe Material und Methoden).

Die Zahl der freigesetzten Viruspartikel 24 Stunden p.i. gab Auskunft über das Ausmaß der Virusreplikation in den verschiedenen Zelltypen. Zwischen den beiden Linien A549 und U1752 waren deutliche Unterschiede feststellbar (Abb.4). Während aus den alveolären Zellen lediglich $1,3 \times 10^6$ PFU/ml freigesetzt wurden (bezogen auf 10^6 infizierte Lungenepithelzellen), waren im Überstand der Bronchialepithelien 9×10^6 PFU/ml nachweisbar. Die Virusreplikation und Freisetzung infektiöser Viruspartikel war also in den bronchiolären Zellen deutlich höher; dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem MTT-Test.

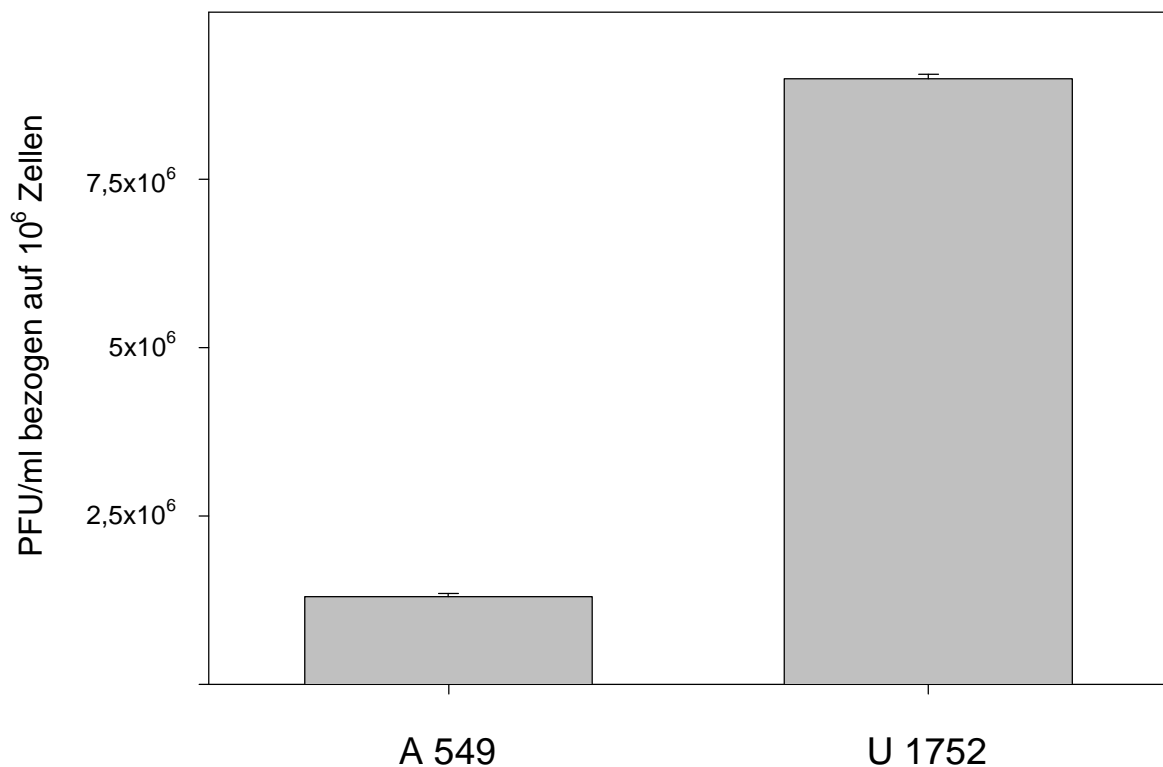


Abb. 5 zeigt die Anzahl der in einem Plaquetest nachgewiesenen infektiösen Viruspartikel. A549- und U1752-Zellen wurden mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert, die Überstände 24 Stunden p.i. gewonnen und auf MDCK-Zellen auf Plaque-Ausbildung getestet. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt und es sind die MW \pm SD gezeigt.

Die Ergebnisse aus den voranstehenden Untersuchungen von Morphologie, MTT-Test, RT-PCR zum Nachweis viraler mRNA und der Plaquetest bewiesen die Replikation und Freisetzung infektiöser Viruspartikel in den untersuchten Zelltypen A549 und U1752. Der Nachweis der Replikation in primären Bronchialepithelzellen (NHBE) konnte anhand der RT-PCR und der Zelluntergang morphologisch gezeigt werden.

3.4. Mechanismus des Zelltodes in Lungenepithelien

Grundsätzlich kann der Untergang einer Zelle durch Apoptose oder durch nekrotische Vorgänge verursacht sein. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden verschiedene Methoden zum Nachweis bzw. Ausschluß von Nekrose und Apoptose durchgeführt.

Apoptotische Zellen verändern die Oberfläche der Plasmamembran in der Weise, daß Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran nach außen transloziert. Phosphatidylserin findet sich dann auf der Oberfläche der Zelle. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Es kann, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, zum Nachweis des auf der Oberfläche exprimierten Phosphatidylserin dienen. Allerdings ist auch bei nekrotischen Zellen durch den Verlust der Membranintegrität Phosphatidylserin nachweisbar, so daß die Abgrenzung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen notwendig wird. Abhilfe schafft die simultane Färbung der DNA mit Propidiumjodid (PJ), die natürlich nur dann gelingt, wenn PJ bis in den Zellkern vordringen kann. Dies ist bei apoptotischen Zellen nicht der Fall, so daß sie sich von nekrotischen Zellen bei dieser Methode durch die fehlende rote Anfärbung des Zellkerns unterscheiden.

Alle in dieser Arbeit benutzten Zellen starben nach Infektion mit Influenza-Virus A/PR/8/34 durch nekrotischen Zelluntergang, was durch die Annexin-V-Darstellung gezeigt werden konnte. Abbildung 6 zeigt nekrotische alveoläre Zellen A549 und nekrotische bronchioläre Zellen U1752. Ebenso durch Nekrose starben die in Abb. 7 dargestellten normalen humanen bronchiolären Epithelien.

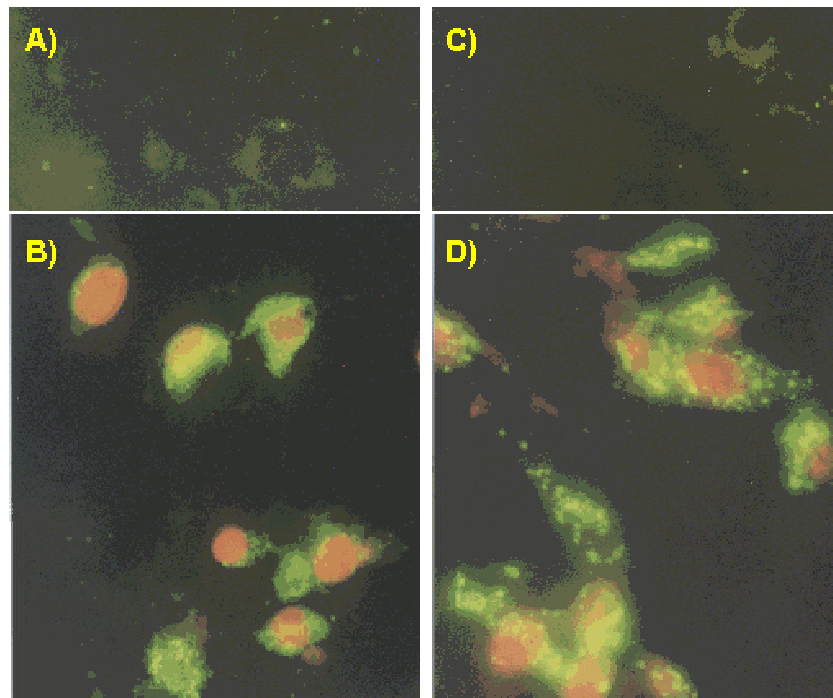


Abb. 6: Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen in der Annexin V-FLUOS- Methode. Apoptotische Zellen stellen sich grüngelb fluoreszierend dar, weil das nach außen translozierte Phosphatidylserin durch den an Annexin V gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff dargestellt werden kann. Bei nekrotischen Zellen lassen sich zusätzlich die Kerne durch Propidiumjodid rot darstellen. Mock-infizierte A549- und U1752-Zellen (Abb. 6 A und C) zeigten erwartungsgemäß keine Anfärbung durch Annexin V. In Abb. 6B (A549) und Abb. 6D (U1752) sind die durch A/PR/8/34-Infektion nekrotischen Zellen über die grüngelbe Anfärbung der Zelloberfläche und den rot dargestellten Zellkern zu identifizieren.

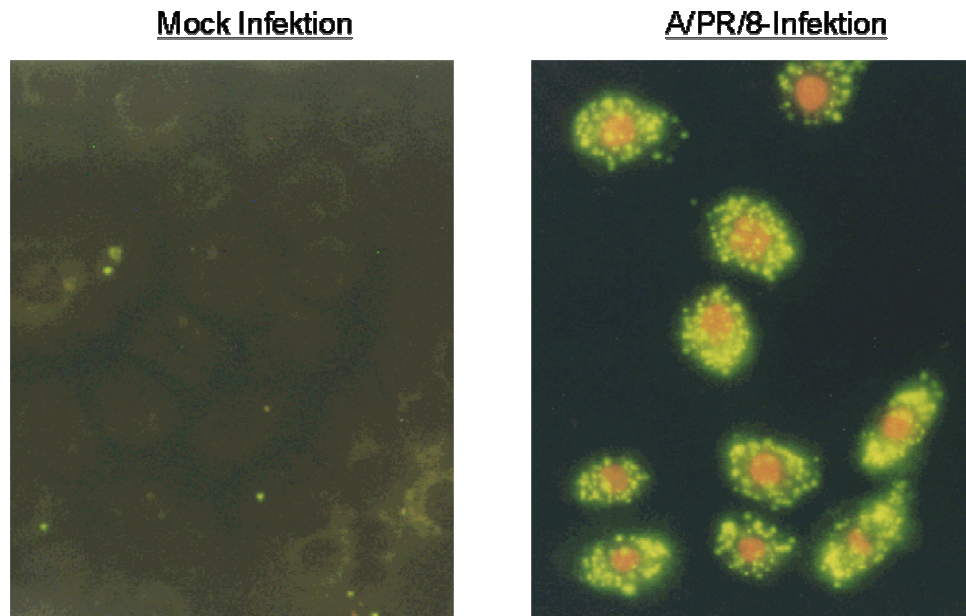


Abb. 7: Darstellung von normalem humanen Bronchialepithel (NHBE) nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 in den Annexin V-FLUOS-Methode. Die nekrotischen Zellen erscheinen grüngelb fluoreszierend und lassen sich von apoptotischen Zelle durch die zusätzliche rote Kernfärbung mit Propidiumjodid unterscheiden.

Das Ergebnis konnte durch andere Methoden bestätigt werden. LDH tritt nach Lyse der Zellen aus nekrotischen Zellen aus und kann im Zellkulturüberstand bestimmt werden. Eine vermehrte LDH-Freisetzung konnte bei infizierten A549-Zellen und U1752-Zellen nachgewiesen werden, dabei beziehen sich die Werte auf die Gesamt-LDH-Menge (intrazelluläres und freigesetztes LDH). Abbildung 8 zeigt die Kinetik der LDH-Freisetzung aus infizierten A549- und U1752-Zellen. 24h p.i. betrug die freigesetzte Menge bei den alveolären Zellen A549 64% des Gesamt-LDH-Gehaltes, die Kontrollzellen wiesen lediglich eine Freisetzung von 35% auf. Die bronchiolären Zellen U1752 zeigten 24h p.i. eine noch deutlichere Schädigung, die LDH-Freisetzung lag hier bei 82%, die der Kontrolle bei 37%.

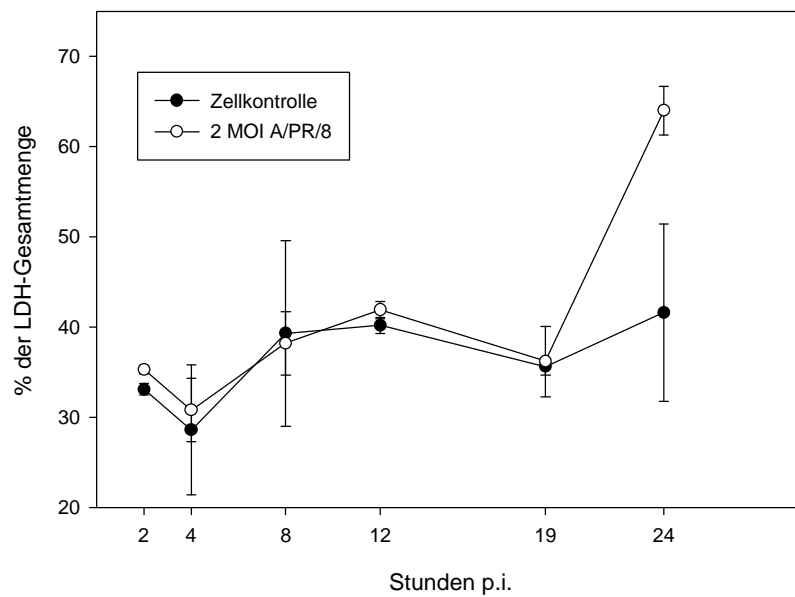


Abb. 8a: LDH-Messung im Kulturüberstand von A549-Zellen. Die Zellen wurden mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert und die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dargestellt sind die MW \pm SD von einem Versuch, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

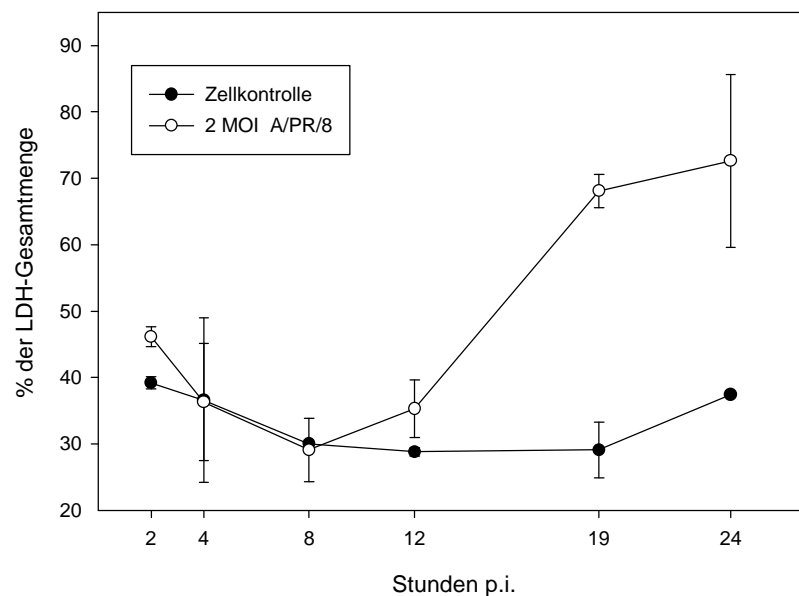


Abb 8b: LDH-Messung im Kulturüberstand von U1752-Zellen. Die Zellen wurden mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert und die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dargestellt sind die MW \pm SD von einem Versuch, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Apoptotische Zellen degradieren ihre DNA in Bruchstücke definierter Länge, die sich in einem Agarosegel als sog. DNA-Leiter nachweisen lassen. Der Nachweis einer DNA-Leiter in infizierten A549- und U1752-Zellen konnte nicht erbracht werden. Abbildung 9 zeigt die DNA der Kontrollzellen und infizierter Zellen 18 bzw. 24 Stunden nach Infektion mit A/PR/8/34. Als Kontrolle dienten apoptotische U937-Zellen (rechte Spur).

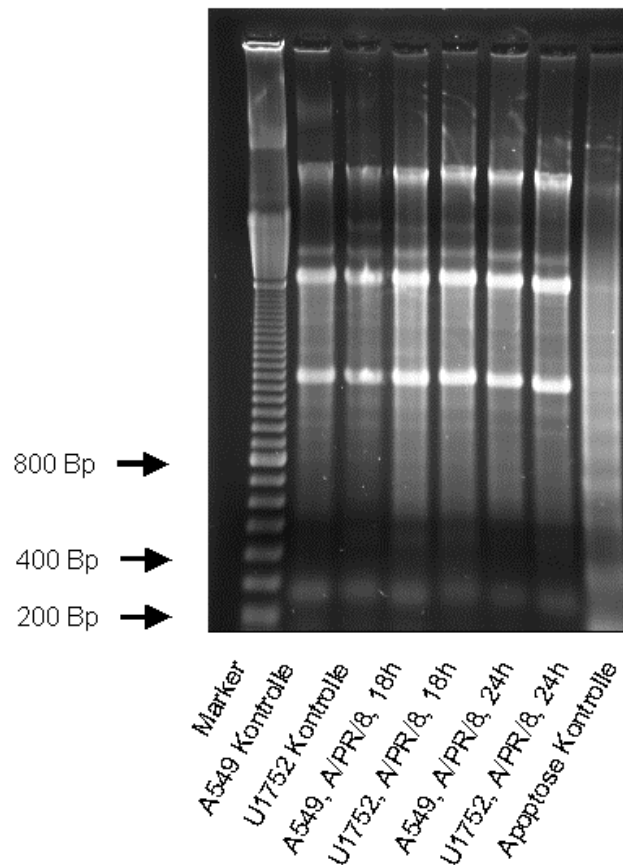


Abb. 9 zeigt mock-infizierte Kontrollzellen und mit 2 MOI A/PR/8/34 infizierte A549- und U1752-Zellen 18 bzw. 24h p.i. Es ist keine DNA-Fragmentation zu erkennen. Als Positivkontrolle dienten apoptotische U937-Zellen (Apoptose-Kontrolle).

Eine weitere Methode, DNA-Fragmentierung nachzuweisen, ist die TUNEL-Methode (terminal transferase labeling); auch mit dieser Methode ließ sich keine durch Influenza A-Virusinfektion verursachte Apoptose nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Auch immunhistochemisch ließ sich keine Regulation von apoptosefördernden Proteinen ($bcl-x_s$) oder apoptoseinhibierenden Proteinen ($bcl-2$, $bcl-x_l$) nachweisen. (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte anhand der durchgeführten Methoden ein Zelltod durch Apoptose nach Infektion mit A/PR/8/34 ausgeschlossen werden; die Lungenepithelzellen sterben also durch Nekrose.

3.5. Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) in Lungenepithelzellen

3.5.1. Bronchioläre Epithelzellen exprimieren konstitutiv MIF

MIF konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden, so auch in der Lunge. Abbildung 10 zeigt eine immunhistochemische Darstellung von konstitutiv exprimiertem MIF in gesundem Bronchialgewebe des Menschen. Das Zytoplasma der Flimmerepithelzellen erscheint bräunlich gefärbt.

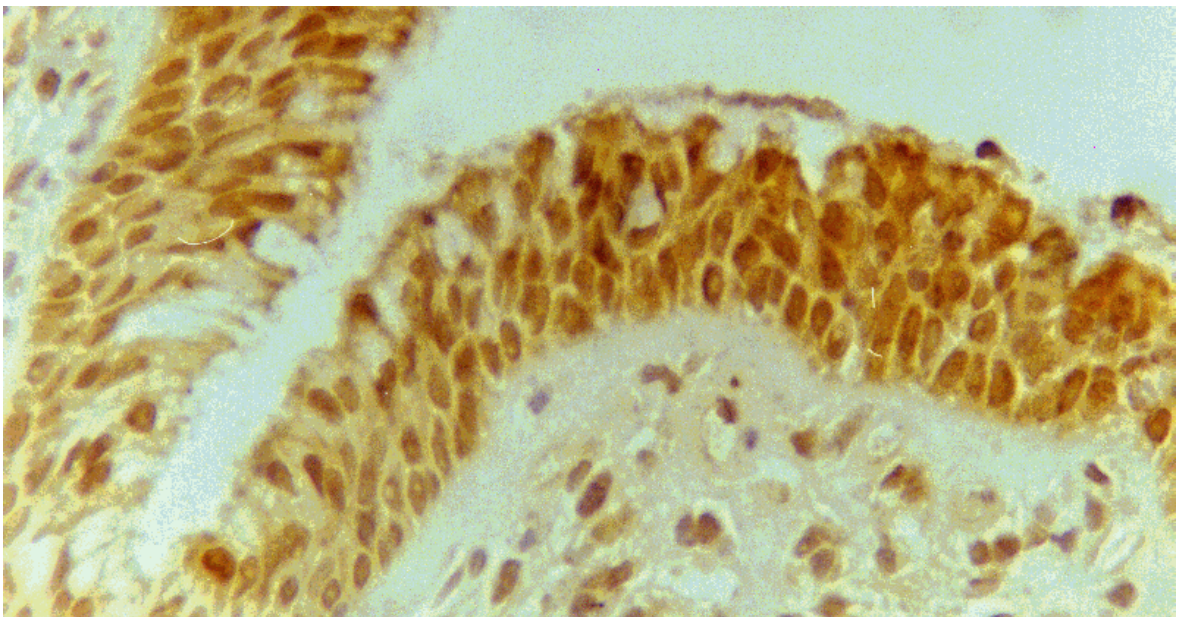


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von MIF in gesundem menschlichen Bronchialgewebe. Die intrazelluläre Darstellung von MIF erfolgte auf Paraffinschnitten der Lunge mittels indirektem Immunoperoxidaseverfahren.

Auch in den Epithelzellen, mit denen in der vorliegenden Arbeit Versuche durchgeführt wurden, konnte die konstitutive Expression von MIF gezeigt

werden. Abb. 11 zeigt den intrazellulären Gehalt an MIF in alveolären (A549) und bronchiolären Epithelien (U1752) in einem Westernblot. In Abb. 12 ist die MIF-Expression in normalen bronchiolären Zellen durch Immunfluoreszenz dargestellt.

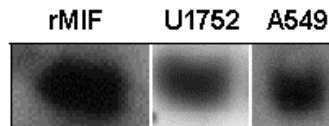


Abb.11: Der Westernblot zeigt die konstitutive Expression des MIF in alveolären (A549) und bronchiolären (U1752) Zellen. Als Standard wurde rekombinanter MIF im Gel aufgetragen.

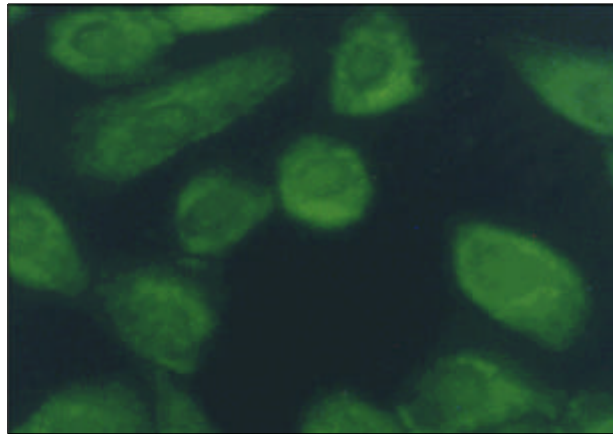


Abb.12 zeigt die konstitutive Expression von MIF in normalen Bronchialepithelien (NHBE) in einer Immunfluoreszenzfärbung. MIF ist homogen im Zytoplasma verteilt.

3.5.2. MIF wird aus Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelien freigesetzt

Im letzten Abschnitt wurde die konstitutive Expression von MIF dargestellt. Im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, daß die Infektion mit Influenza A-Viren zu einer Freisetzung des intrazellulär gespeicherten MIF aus Lungenepithelzellen führte.

Intra- und extrazellulärer MIF konnten im Westernblot nachgewiesen werden; in den Kulturüberstand freigesetztes MIF mußte zuvor ankonzentriert werden (siehe Material und Methoden).

In Abbildung 13 ist die Freisetzung im zeitlichen Verlauf der Infektion dargestellt. Sowohl alveoläres Epithel A549 (Abb. 13a) als auch bronchioläres Epithel U1752 (Abb. 13b) zeigte die entsprechende Abnahme von MIF in den zellulären Speichern, wenn MIF in die Umgebung abgegeben wurde. 8 Stunden nach der Infektion mit A/PR/8/34 konnte bei beiden Zelllinien keine Sekretion von MIF nachgewiesen werden, diese war erst 24 Stunden p.i. zu beobachten.

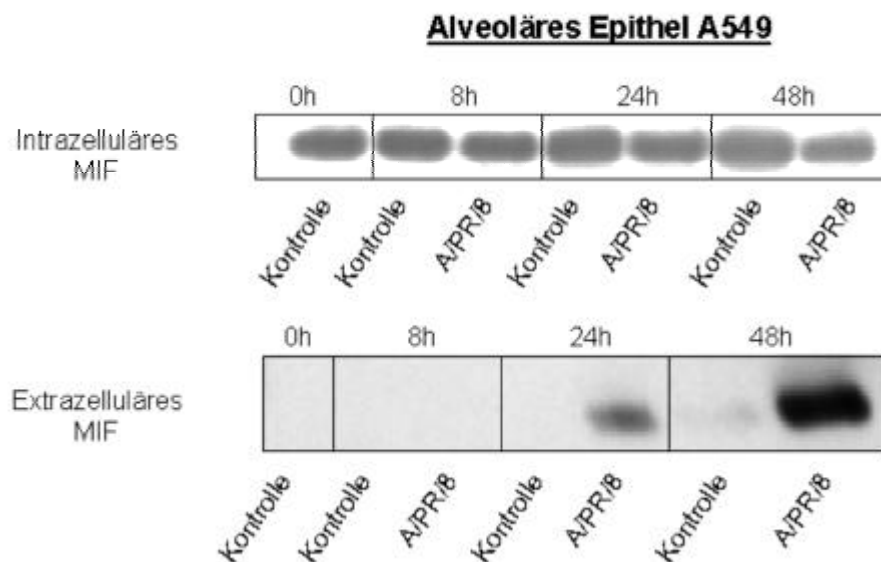


Abb.13a zeigt in einem Westernblot die Abnahme von MIF in den intrazellulären Speichern und die entsprechende Zunahme des freigesetzten MIF in den Zellüberständen bei alveolären Zellen nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34.

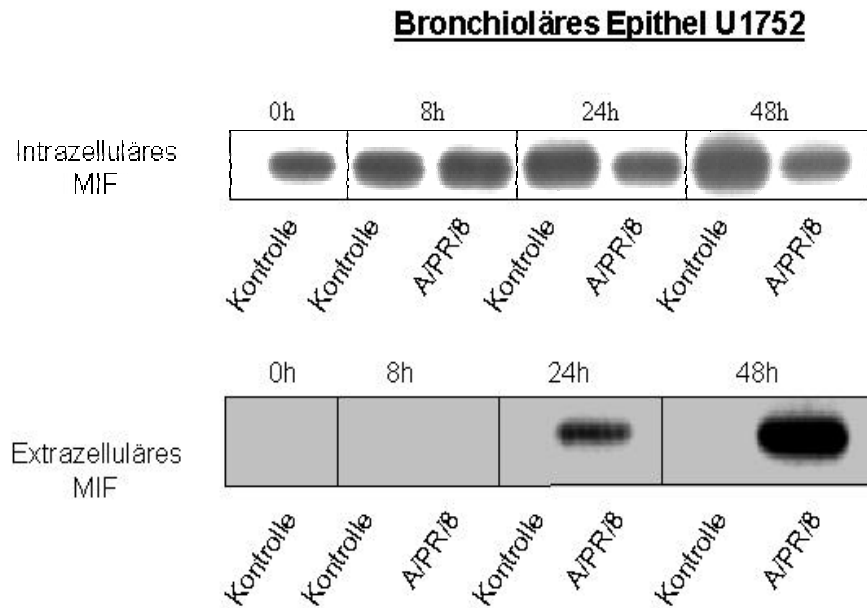


Abb.13b zeigt in einem Westernblot die Abnahme von MIF in den intrazellulären Speichern und die entsprechende Zunahme des freigesetzten MIF in den Zellüberständen bei bronchiolärem Epithel nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34.

Die Quantifizierung der freigesetzten MIF-Menge konnte in einem spezifischen MIF-ELISA erbracht werden. Abb. 14a zeigt die freigesetzte MIF-Menge aus virusinfizierten A549-Zellen, das Maximum stellte sich nach 48h p.i. um 2,7 ng/ml MIF ein. Die freigesetzte Menge an MIF aus U1751-Zellen erwies sich als wesentlich höher und hatte ein Maximum bei 13,2 ng/ml 48 Stunden nach der Infektion (Abb. 14b).

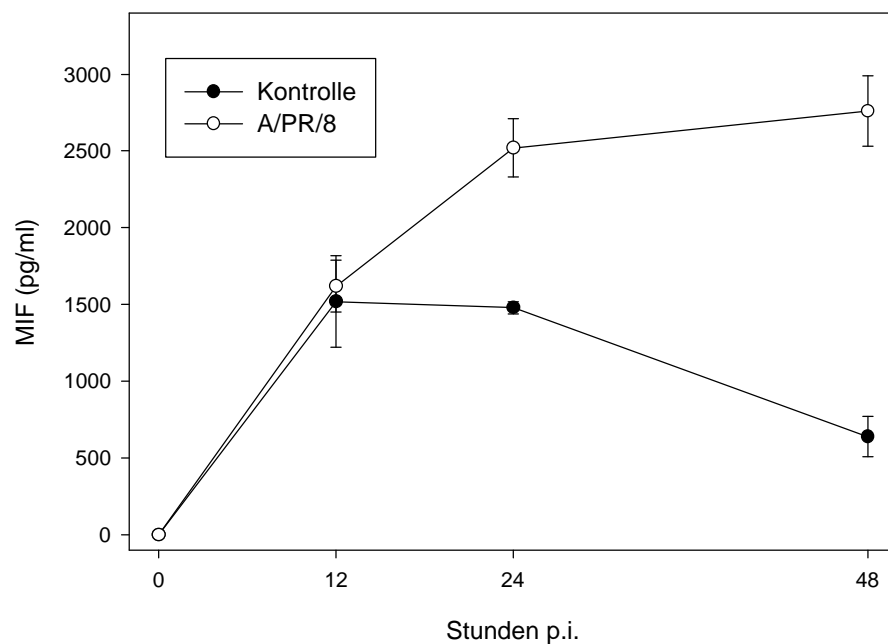


Abb.14a zeigt in ELISA-Daten die Quantifizierung der freigesetzten Menge an MIF nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 in A549-Zellen. Die Überstände der infizierten Zellen und der Kontrollzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und im MIF-spezifischen ELISA untersucht. Gezeigt sind die MW \pm SD eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

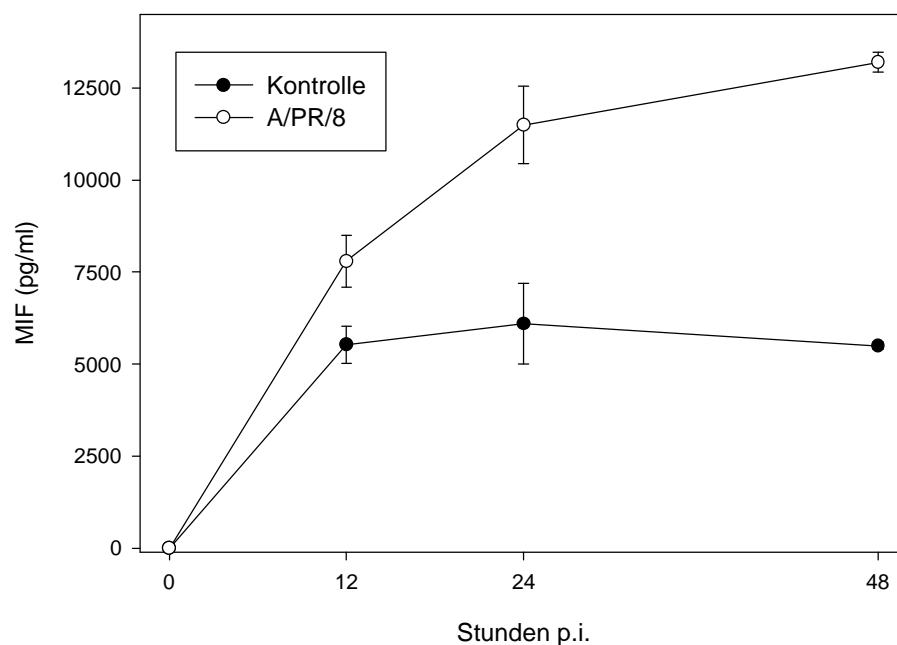


Abb.14b zeigt in ELISA-Daten die Quantifizierung der freigesetzten Menge an MIF nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 in U1752-Zellen. Die Überstände der infizierten Zellen und der Kontrollzellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und im MIF-spezifischen ELISA untersucht. Gezeigt sind die MW \pm SD eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

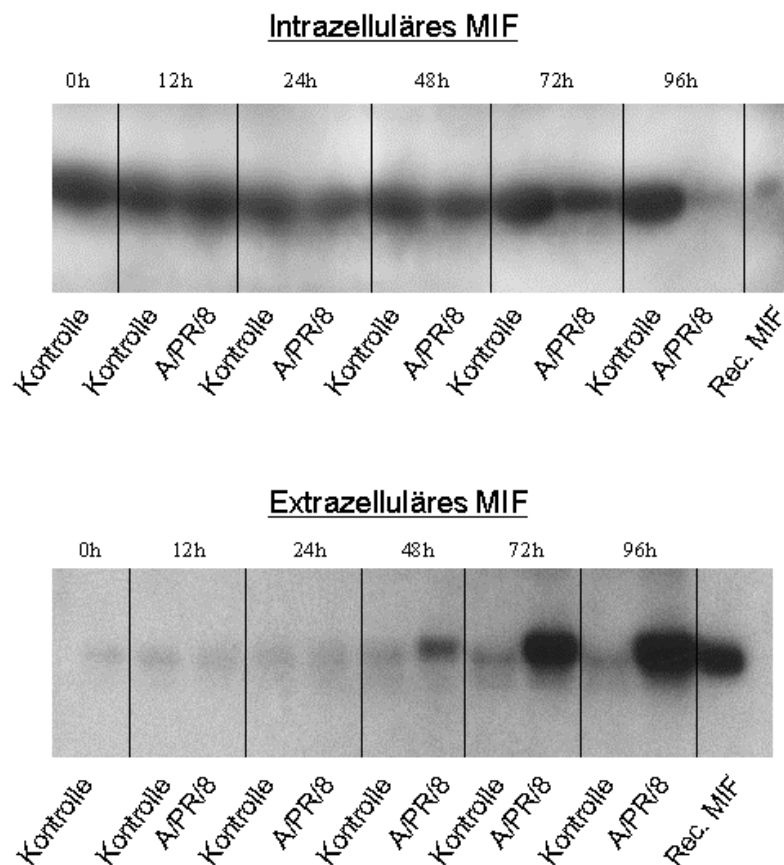


Abb.15 stellt in einer Kinetik die intrazelluläre und die freigesetzte Menge an MIF aus primärem Bronchialepithel nach Influenza A-Virusinfektion (A/PR/8/34; 2 MOI) im Westernblot dar. Als Standard wurde rekombinanter MIF aufgetragen.

Im MIF-ELISA wurden bei diesen Zellen 48h p.i. 2000 pg/ml nachgewiesen (Abb. 16).

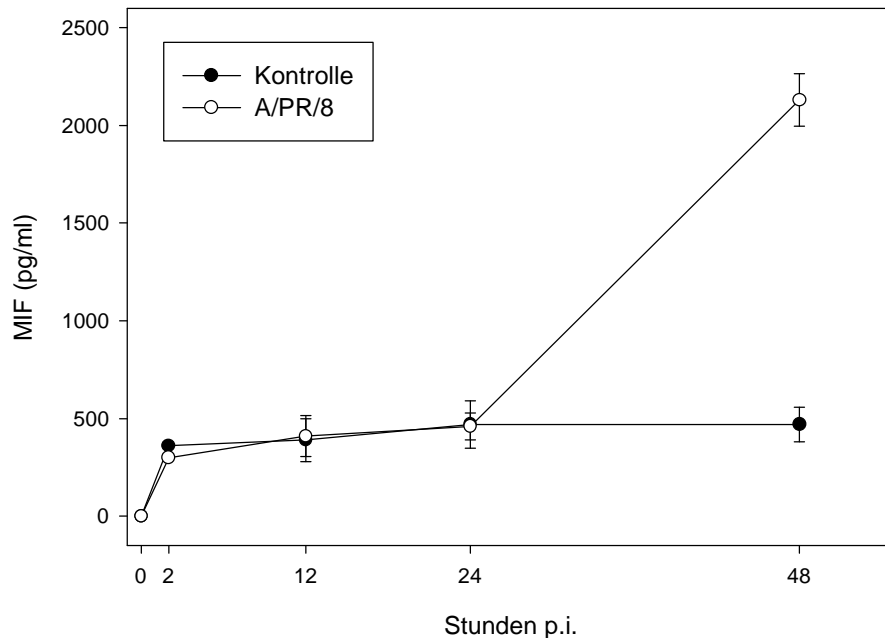


Abb.16 Kinetik der MIF-Freisetzung aus primärem Bronchialepithel des Menschen nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 im ELISA dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD eines Versuchs, der zu jeweiligen Zeitpunkt in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Sowohl im Westernblot als auch im ELISA konnte die Freisetzung von MIF aus infizierten primären Bronchialepithelzellen erst nach 48h p.i. beobachtet werden; im Vergleich war die Sekretion von MIF bei infizierten Zellen der Linien A549 und U1752 bereits nach 24h p.i. nachweisbar.

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung ließ eine homogene Verteilung von MIF in den zytoplasmatischen Speichern nicht-infizierter Zellen erkennen (Abb. 17 b). Dahingegen veränderte sich das Verteilungsmuster in virusinfizierten Zellen: MIF konzentrierte sich in granulärer Form im Zytoplasma und wurde dann an der Oberfläche der sterbenden Zellen freigesetzt (Abb. 17 c).

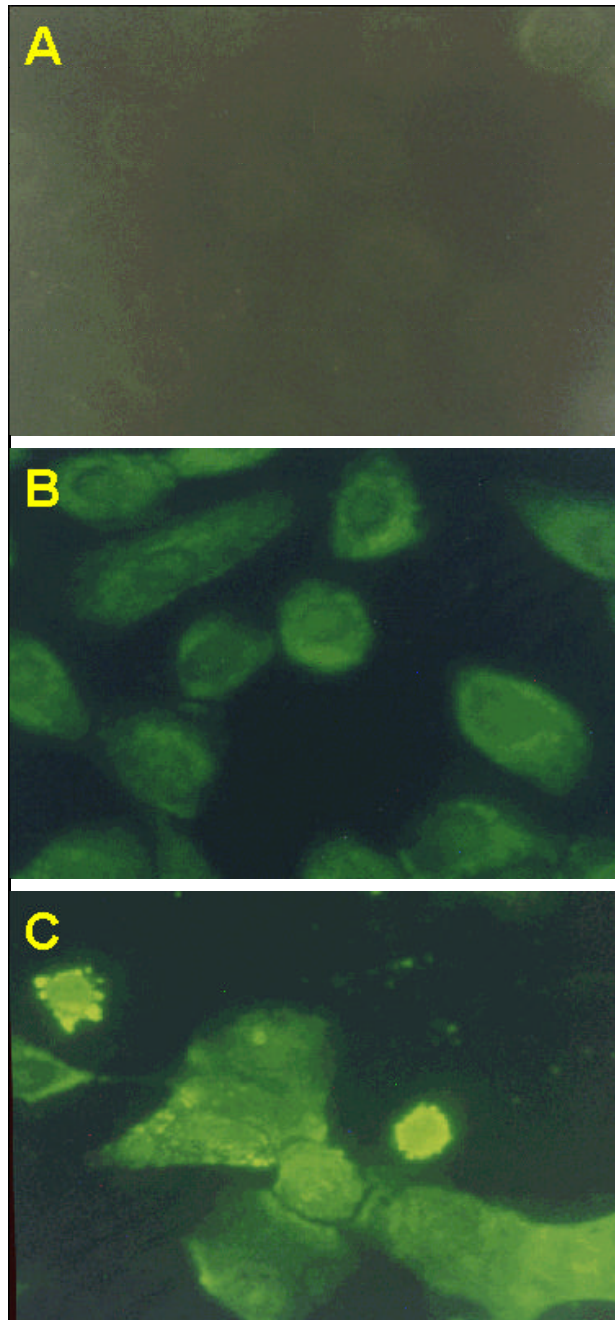


Abb.17 Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von MIF in mock-infizierten (Abb. 17b) und Influenza A-virusinfizierten (Abb.17c) normalen humanen Bronchialzellen (NHBE) 24 Stunden nach der Infektion. Abb.17a zeigt die Kontrolle, die ohne 1. Antikörper (α -MIF) inkubiert wurde.

3.5.3. Aus Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelien wird bioaktiver MIF freigesetzt

Es stellt sich die Frage, ob das aus den intrazellulären Speichern nach Infektion freigesetzte MIF überhaupt noch eine biologische Wirksamkeit zeigt; immerhin stammt es aus nekrotischen Zellen. In apoptotischen Zellen dagegen werden Wirkstoffe in membranumhüllte Granula verpackt und insofern geschützt in die Umgebung freigesetzt. Um die Frage nach der biologischen Wirksamkeit zu klären, bot sich ein Calcium-Influx-Assay an (Wennemuth et al., 2000).

Primäre Stromazellen der Ratte (Peritubulärzellen; Prostata; 3. oder 4. Passage) reagieren spezifisch auf MIF (Wennemuth et al., 1999): es erfolgt eine Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Ca-Speichern in diesen Zellen, wenn MIF zugegeben wird.

Rekombinantes MIF wurde in einem Vorversuch auf diese Zellen gegeben und es erfolgte die bekannte Calciummobilisierung (Abb. 18a). Dieser Einstrom konnte spezifisch blockiert werden, wenn rMIF zuvor mit einem spezifischen anti-MIF-mAb inkubiert und der entstehende Komplex durch Immunpräzipitation mit Protein G entfernt wurde (Abb. 18b).

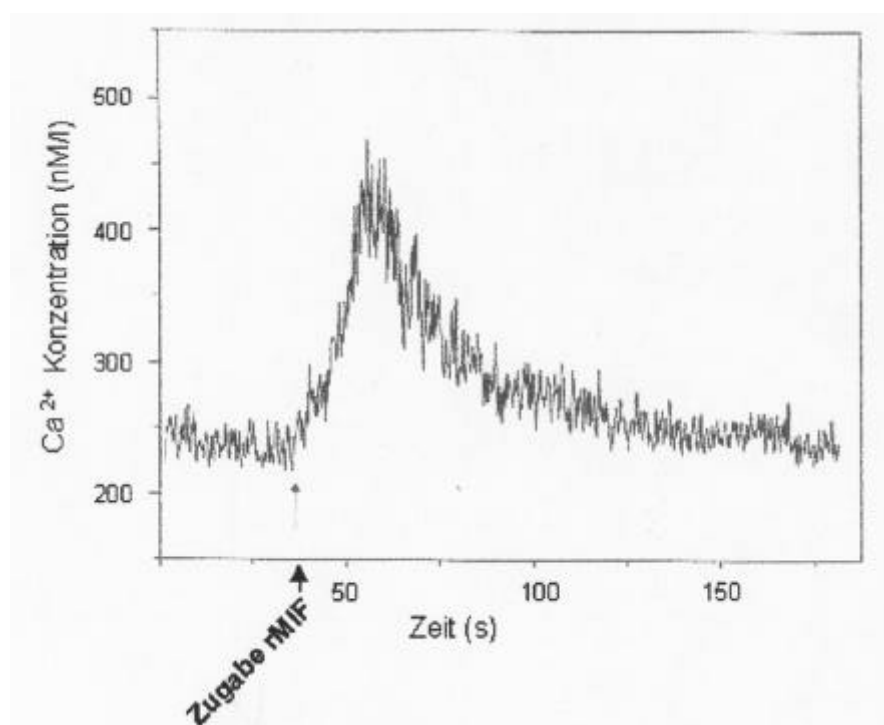


Abb. 18a Spezifische Mobilisierung von Calcium in peritubulären Zellen der Ratte durch MIF.

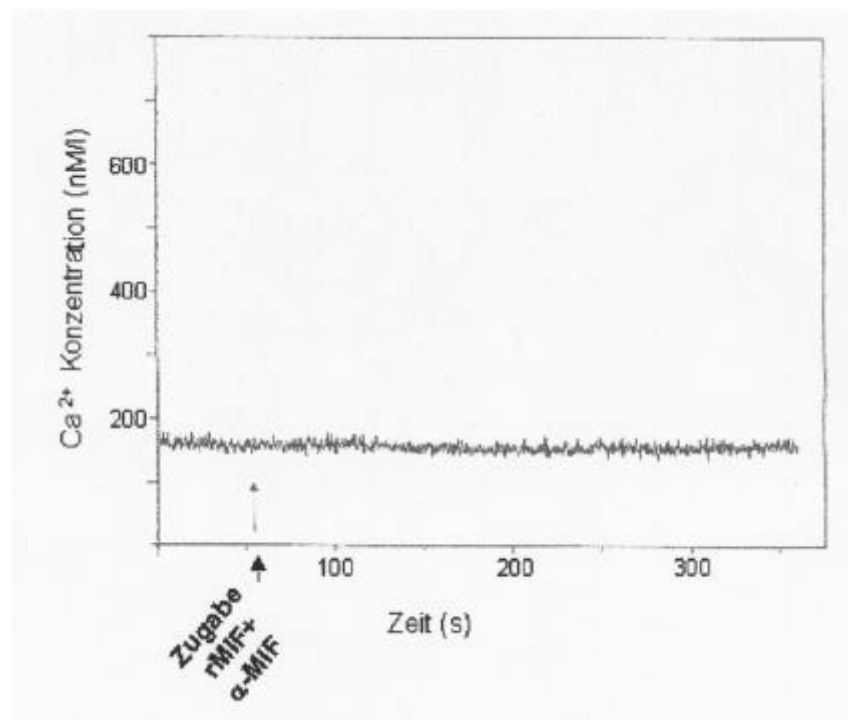


Abb. 18b Die MIF-spezifische Ca-Freisetzung aus intrazellulären Speichern von Peritubulärzellen kann durch einen spezifischen Antikörper blockiert werden.

Der Nachweis von biologisch aktivem MIF im konditionierten Überstand infizierter Lungenepithelien (A549 und U1752) konnte mit dieser Methode zweifelsfrei erbracht werden. Abb. 19a zeigt den Anstieg intrazellulären Calciums nach Zugabe von o.g. Überständen von alveolären Zellen A549, Abb. 19b den Effekt der Überstände von bronchiolären Zellen U1752. Der Überstand von mockinfizierten Kontrollzellen erbrachte keine Reaktion der Rattenstromazellen im Sinne eines Calcium-Influxes.

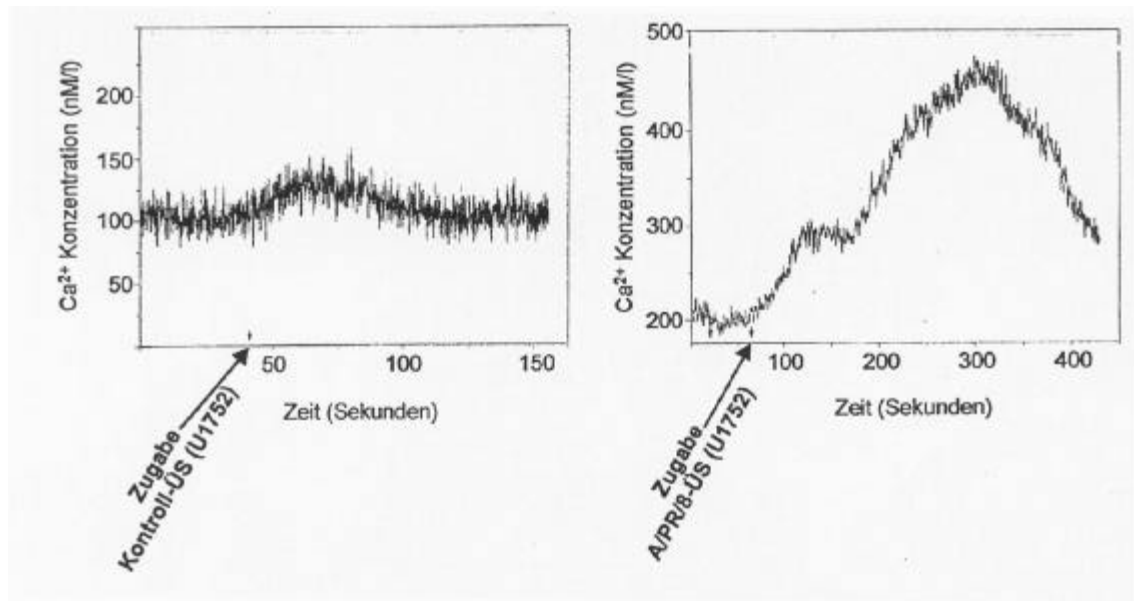


Abb. 19a Konditionierte Überstände (ÜS) von A/PR/8/34-infizierten alveolären Zellen (A549), die MIF enthielten, lösten in Rattenstromazellen einen Calciumeinstrom aus. Die entsprechenden Überstände von Mock-infizierten Zellen konnten keinen Ca-Einstrom auslösen, sie enthielten kein oder nur sehr wenig MIF.

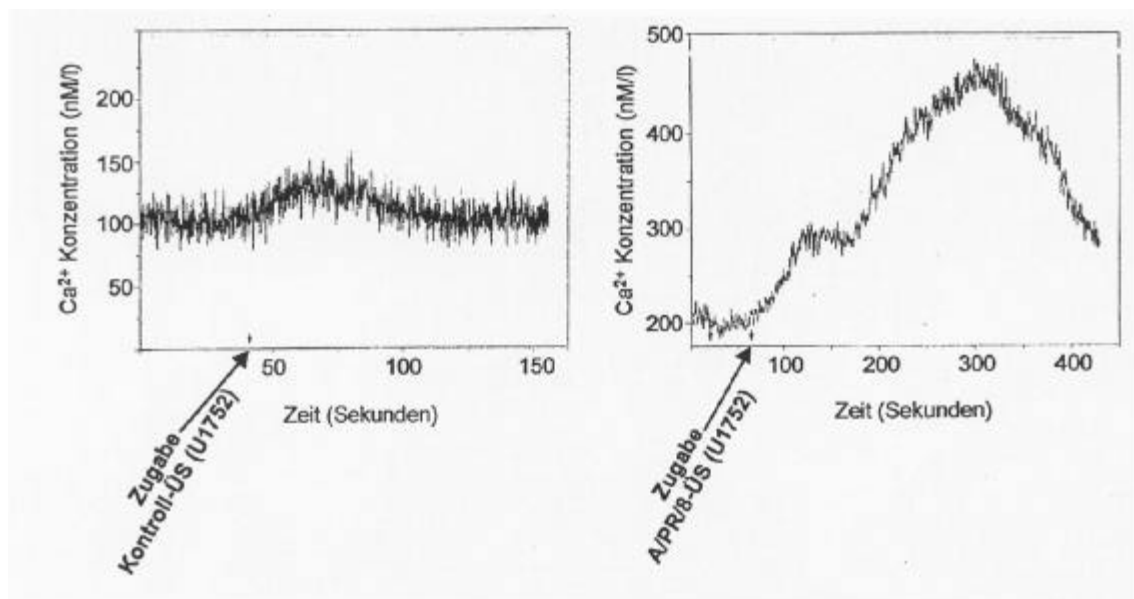


Abb. 19b Konditionierte Überstände (ÜS) von A/PR/8/34-infizierten bronchiolären Zellen (U1752), die MIF enthielten, lösten in Rattenstromazellen einen Calciumeinstrom aus. Die entsprechenden Überstände von Mock-infizierten Zellen konnten keinen Ca-Einstrom auslösen, sie enthielten kein oder nur sehr wenig MIF.

Im konditionierten Medium waren darüber hinaus weitere biologisch aktive Substanzen zu erwarten, die auf die Rattenstromazellen hätten aktivierend wirken können. Um den Calciumeinstrom eindeutig dem freigesetzten MIF

zuordnen zu können, wurden Überstände aus infizierten Zellen mit einem monoklonalen anti-MIF-Antikörper inkubiert und der entstandene Komplex mit Protein G immunpräzipitiert. In Abbildung 20 lässt sich die erfolgreiche Blockierung von MIF beispielhaft aus Überstand infizierter U1752-Zellen durch einen spezifischen Antikörper ablesen: Kontrollüberstand löst keinen Calciumeinstrom aus, ebenso der mit anti-MIF behandelte Überstand. Zur Überprüfung der Zell-Integrität wurde anschließend unbehandelter Überstand zugegeben und es erfolgte der zu erwartende Ca-Einstrom. So konnte die biologische Wirksamkeit von MIF aus dem Überstand Influenza A-virusinfizierter Lungenepithelzellen nachgewiesen und darüber hinaus diese biologische Aktivität eindeutig MIF zugewiesen werden.

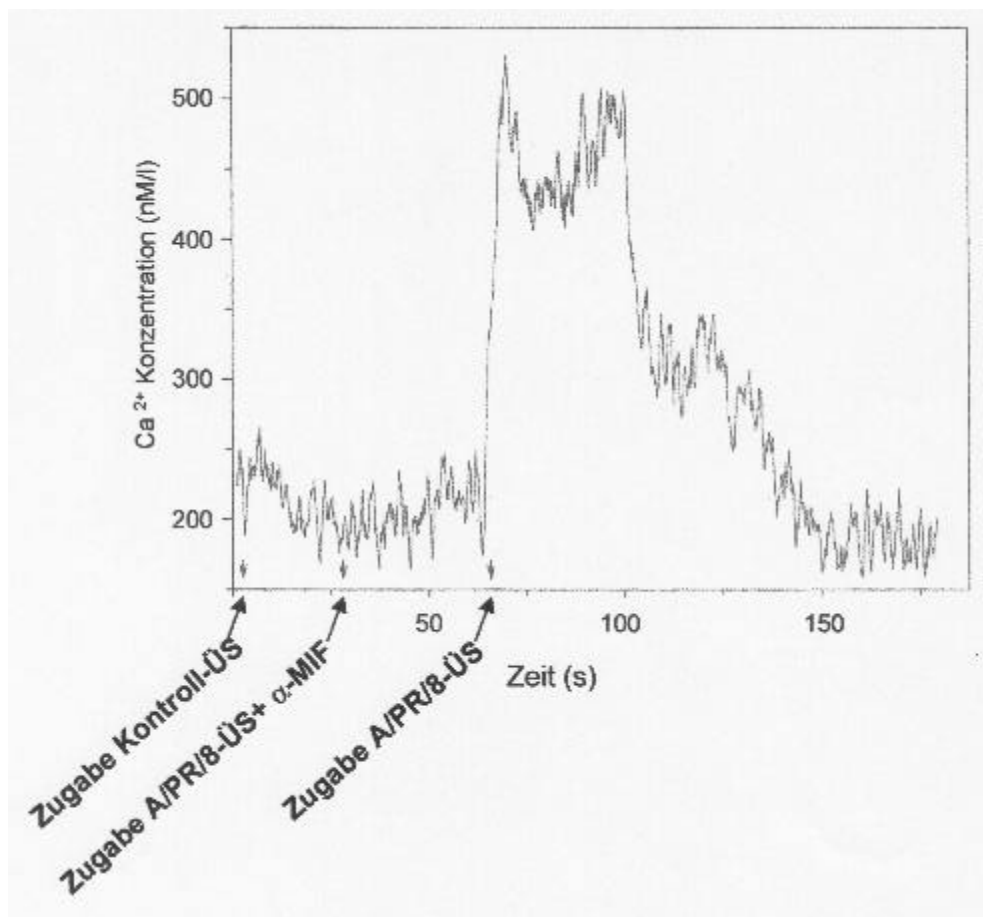


Abb. 20 Rattenstromazellen reagierten nicht mit Calciumeinstrom, wenn sie mit konditioniertem Kontrollüberstand oder mit Überstand inkubiert wurden, der zuvor mit einem spezifisch gegen MIF gerichteten Antikörper behandelt worden waren. Wurde dagegen auf dieselben Zellen der konditionierte, aber unbehandelte Überstand von A/PR/8/34 infizierten Zellen zugegeben, so reagierten die Zellen wie erwartet mit einem deutlichen Calciumeinstrom.

3.5.4. Einfluß von inaktivierten Influenza A-Viren auf die MIF-Freisetzung aus alveolärem und bronchiolären Epithel

Um die Frage zu untersuchen, ob Influenza-Viren in der Zelle replizieren müssen oder ob es für die induzierte Sekretion von MIF ein verantwortliches virales Protein gibt, wurden inaktivierte A/PR/8/34-Viren in einem Versuch eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die Infektion mit aktivem, infektiösem Virus.

Werden Influenza-Viren einer UV-Behandlung (45 min, 245 nm) ausgesetzt, so wird das virale RNA-Genom durch Strangbrüche und Crosslinking zerstört, während die Fusionsaktivität des Hämagglutinins und die Funktion anderer viraler Proteine weitgehend erhalten bleiben.

Nach einer Behandlung der Virussuspension bei 56°C (45 min) wird zwar nicht die Adsorption, Endozytose und Fusion oder die Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma der Wirtszelle behindert, aber es findet durch die Inaktivierung der viralen Polymerase keine Replikation statt.

Durch Erhitzen der Virussuspension auf 100°C sind alle Virusproteine irreversibel denaturiert, so daß bereits Adsorption und Endozytose verhindert werden.

In einem Westernblot für MIF-Protein konnte dargestellt werden, daß allein aktives Virus einen Abgabe von MIF aus den intrazellulären Speichern bewirkte. Abbildung 20 stellt MIF in den Überständen und intrazellulären Gehalt an MIF von bronchiolären Epithelzellen U1752 nach 24-stündiger Inkubation mit den unterschiedlich vorbehandelten Viren gegenüber. Da MIF nur bei mit aktivem Virus behandelten Zellen im Überstand erschien, war auch bei den Zellysaten nur in diesem Fall eine Abnahme des MIF nachzuweisen.

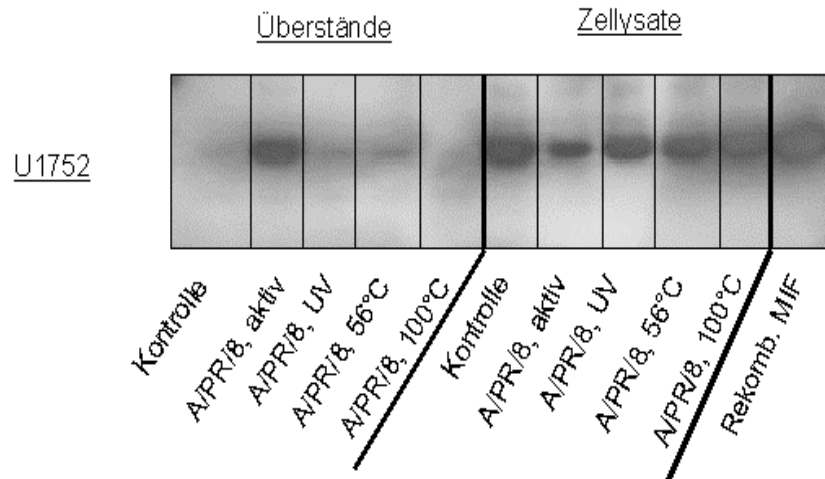


Abb. 21: Einfluß von inaktivierten Influenza A-Viren auf die Freisetzung von MIF aus bronchiolären Epithelzellen U1752. Gezeigt ist in einem Westernblot der intrazelluläre MIF-Proteingehalt und der Gehalt in Zellüberständen nach Infektion der Zellen mit aktivem oder inaktiviertem A/PR/8/34-Virus. Eingesetzt wurden jeweils 2 MOI des aktiven oder der UV-, 56°C- und 100°C-behandelten Viren.

3.5.6. Nachweis der MIF-mRNA in alveolären und bronchiolären Epithelzellen

Die Expression der mRNA für MIF wurde indirekt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und direkt durch Northern Blotting nachgewiesen. Der Untersuchung auf eine konstitutive Expression der mRNA für MIF erfolgte sowohl in den Lungenepithelzelllinien A549 und U1752, als auch im normalen humanen Bronchialepithel.

3.5.6.1. Nachweis der konstitutiven Expression von MIF-mRNA über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Primerpaar für MIF schließt ein Fragment von 370 Basenpaaren Länge ein. In Abbildung 22 ist eine Analyse der MIF-mRNA nicht-infizierter, unstimulierter Zellen in einer PCR dargestellt. Sowohl in den Zelllinien A549,

U1752 als auch in primären Bronchialepithelien konnte eine konstitutive Expression der MIF-mRNA nachgewiesen werden.

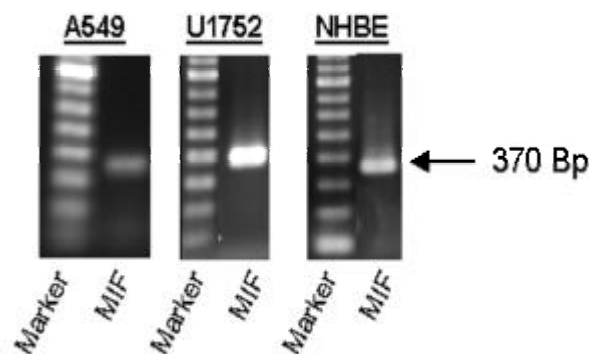


Abb. 22: MIF-mRNA-Nachweis mittels RT-PCR-Technik. Dargestellt ist die exprimierte mRNA in jeweils unstimulierten A549-, U1752- und primären Bronchialepithelzellen NHBE.

3.5.6.2 MIF-mRNA-Expression in A/PR/8/34-infizierten

Lungenepithelzellen: Nachweis im Northern Blot

Die konstitutive Expression der mRNA in alveolären und bronchiolären Zellen für MIF konnte auch im Northern Blot gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Veränderung der Expression in Influenza-A-virusinfizierten Zellen untersucht. Zum Vergleich wurde parallel das konstitutiv exprimierte „Housekeeping-Gen“ GAPDH dargestellt.

In A549- und U1752-Zellen konnte keine Regulation der Expression von MIF im zeitlichen Verlauf der Infektion von 4 bis 48 Stunden p.i. mit A/PR/8/34 nachgewiesen werden (Abb. 23). Die Abnahme der mRNA-Menge nach 24 bzw. 48 h p.i. bei U1752-Zellen war mit dem massiven Zelluntergang durch die Infektion zu erklären.



Abb. 23: Darstellung der mRNA von MIF alveolärer Zellen A549 und bronchiolärer Zellen U1752 im Vergleich zur mRNA von GAPDH im Northern Blot. 0h, 4h, 8h, 24h und 48h p.i. wurden als Zeitpunkte der Kinetik gewählt und jeweils Mock-infizierte Kontrolle und A/PR/8/34-infizierter Ansatz (2MOI) untersucht.

3.5.6.3. Nachweis der MIF-mRNA-Expression in Zelllinien und primären humanen Bronchialepithelien nach Infektion mit A/PR/8/34 mittels RT-PCR

Abbildung 24 zeigt in einer PCR die unveränderte Expression von MIF-mRNA in A549- und U1752-Zellen, welche 24 Stunden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert waren.

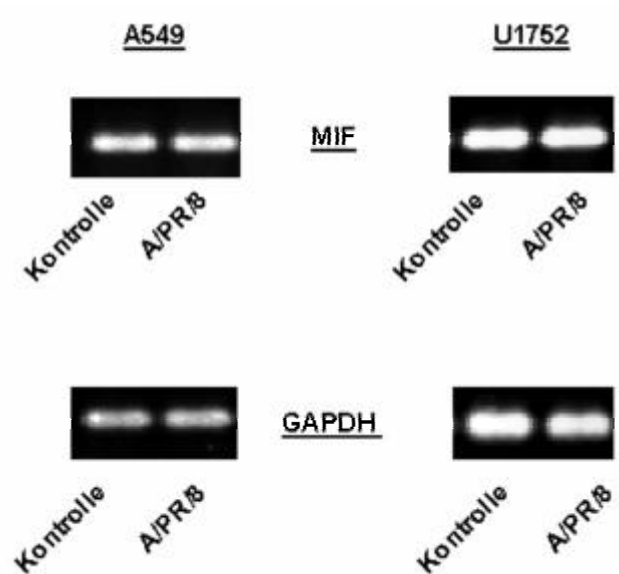


Abb. 24: Nachweis der MIF-mRNA (PCR-Fragment von 370 bp Länge) in alveolären (A549) und bronchiolären (U1752) Epithelzellen 24 Stunden nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Im Vergleich dazu die GAPDH-Expression (PCR-Fragment 300 bp Länge) in den entsprechenden Ansätzen.

Die primären Bronchialepithelzellen NHBE zeigten ebenso wie die Zelllinien keine Beeinflussung der mRNA-Expression für MIF unter einer A/PR/8/34-Infektion. Der Nachweis erfolgte bei 12, 24 und 48 Stunden p.i. ebenfalls mittels MIF-spezifischer PCR (Abb. 25).

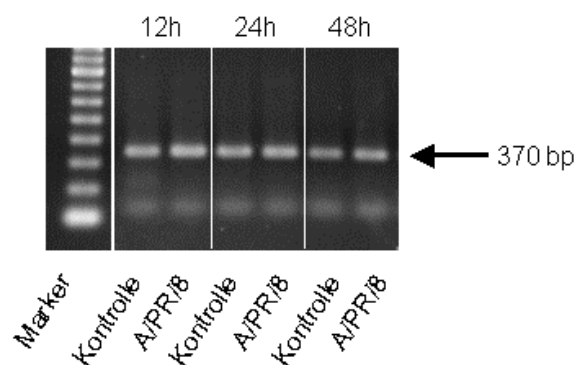


Abb 25: Nachweis der mRNA für MIF (PCR-Fragment 370 bp Länge) in primären Bronchialepithelzellen NHBE in einer Kinetik über 48 Stunden nach Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34.

3.6. Induktion von Chemokinen in Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen

Bei viralen Infektionen kann es von entscheidender Bedeutung für den Krankheitsverlauf sein, daß möglichst schnell immunkompetente Zellen an den Entzündungsort gelockt werden.

Chemokine können in unterschiedlichen Geweben nach Induktion synthetisiert und freigesetzt werden (Baggiolini et al., 1994) und somit das Einwandern der verschiedenen Typen von Leukozyten veranlassen. Somit erschien es sinnvoll, eine mögliche Chemokininduktion in den gewählten Zellen zu untersuchen. Von den alveolären Zellen A549 war bekannt, daß sie nach Stimulation IL-8 und MCP-1 exprimieren (Standiford et al., 1990/1991), andere Arbeiten haben gezeigt, daß Infektionen mit 'Respiratory Syncytial Virus' (RSV) Chemokine induzieren können (Noah et al., 1993; Becker et al., 1997).

3.6.1. CXC-Chemokine: Nachweis der Proteine

3.6.1.1. Interleukin-8

Interleukin-8 wirkt vorzugsweise auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch. In beiden verwendeten Zelllinien A549 und U1752 konnte nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virusstamm A/PR/8/34 eine Induktion und Freisetzung von IL-8 nachgewiesen werden. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen die Sekretion im zeitlichen Verlauf über 48 Stunden nach der Infektion bei alveolären (A549) und bronchiolären Zellen (U1752). Die Differenz von Kontrollansatz zu Infektion war nach 24 Stunden noch marginal, stieg nach 48 Stunden aber deutlich an; es wurden Werte bis 2500 pg/ml erreicht.

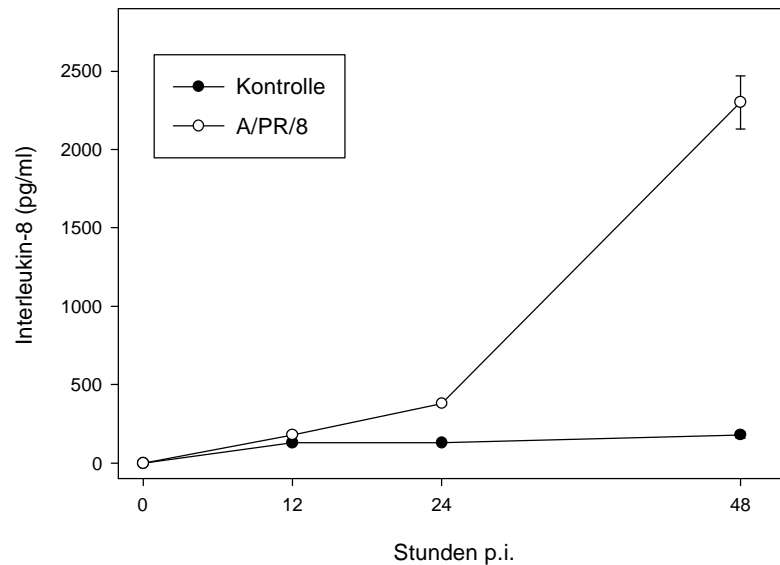


Abb. 26: Kinetik der IL-8-Freisetzung aus alveolärem Epithel A549. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

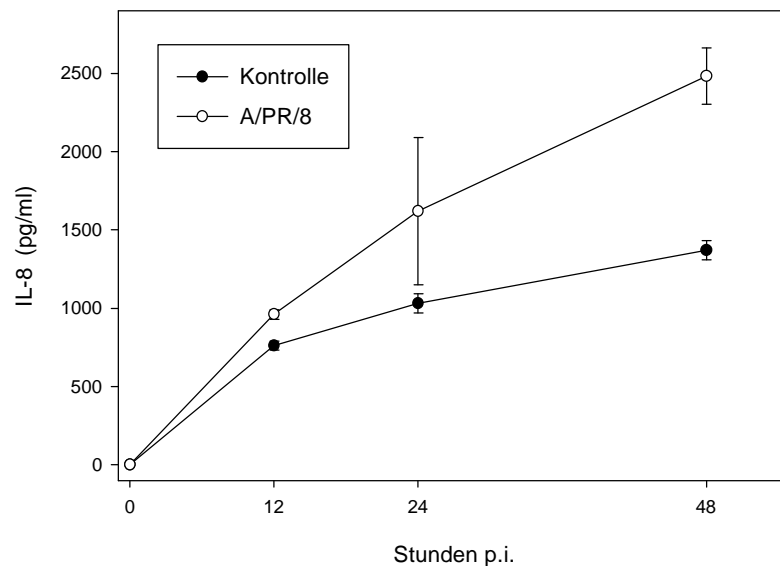


Abb. 27: Kinetik der IL-8-Freisetzung aus bronchiolärem Epithel U1752. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

Die primären bronchiolären Zellen zeigten dagegen einen verzögerten Verlauf der IL-8-Freisetzung, wobei zudem geringere Spiegel (1200 pg/ml) als bei den Zelllinien erreicht wurden. Erst nach 48 h p.i. war eine Erhöhung der sezernierten IL-8-Menge erkennbar und stieg bis zum 72h-Wert nochmals deutlich an.

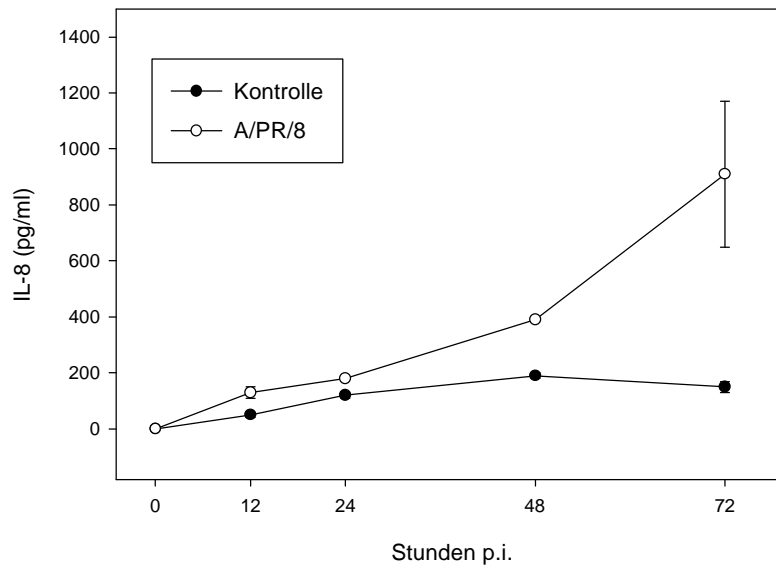


Abb. 28: Kinetik der IL-8-Freisetzung aus normalem bronchiolären Epithel (NHBE). Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

3.6.1.2. GRO- α

Als ein weiterer Vertreter der CXC-Chemokinfamilie wurde GRO- α in den Überständen Influenza A-virusinfizierter Zellen untersucht. Die alveolären Zellen A549 setzten GRO- α erst 48 Stunden nach der Infektion frei (Abb. 29), wobei 5000 pg/ml im ELISA bestimmt werden konnten. Dagegen war bei den bronchiolären Zellen U1752, in Abb. 30 dargestellt, die Freisetzung des CXC-Chemokins bereits nach 24 Stunden im GRO- α -ELISA nachweisbar (320 pg/ml) und stieg dann auf Werte um 500 pg/ml an, lag aber insgesamt niedriger als bei den alveolären Zellen.

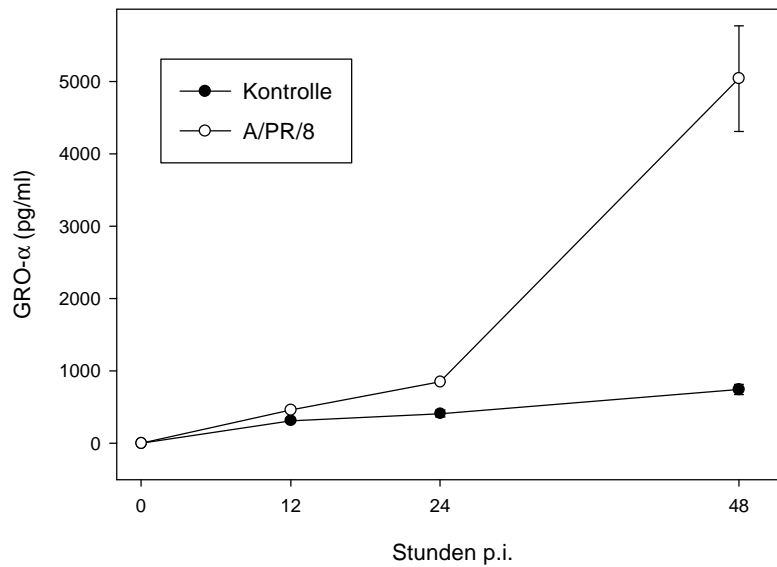


Abb. 29: Kinetik der GRO- α -Freisetzung aus alveolärem Epithel A549. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

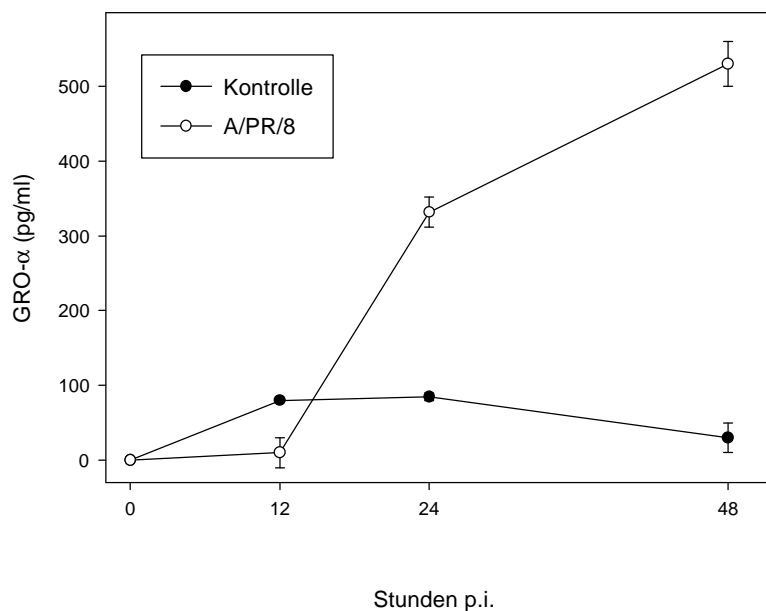


Abb. 30: Kinetik der GRO- α -Freisetzung aus bronchiolärem Epithel U1752. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

In primären bronchiolären Epithelzellen (NHBE) konnten keine nachweisbaren Mengen an GRO- α im ELISA festgestellt werden.

3.6.2. CC-Chemokine: Nachweis der Proteine

3.6.2.1. RANTES

Auch bei dem CC-Chemokin RANTES, welches beispielsweise chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen wirkt, waren wesentlich höhere Spiegel bei infizierten alveolären Zellen (48 h p.i. 8000 pg/ml; Abb. 31) meßbar, als dies bei infizierten bronchiolären Zellen der Fall war (48 h p.i.:300 pg/ml; Abb. 32).

Die Abbildung 31 läßt den Verlauf der RANTES-Freisetzung aus alveolären Zellen A549 nach Infektion mit A/PR/8/34 über 48 Stunden erkennen, Abb. 32 zeigt die Kinetik bei bronchiolären Zellen U1752 ebenfalls über 48 Stunden nach der Infektion.

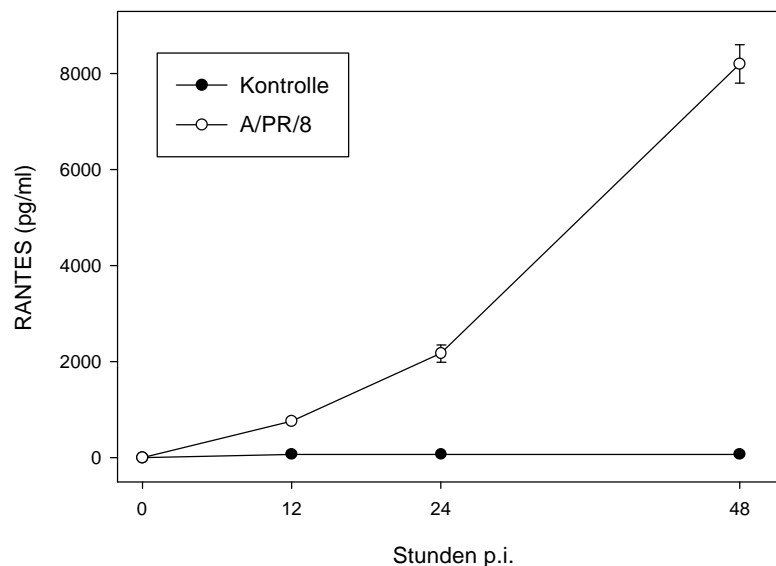


Abb. 31: Kinetik der RANTES-Freisetzung aus alveolärem Epithel A549. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

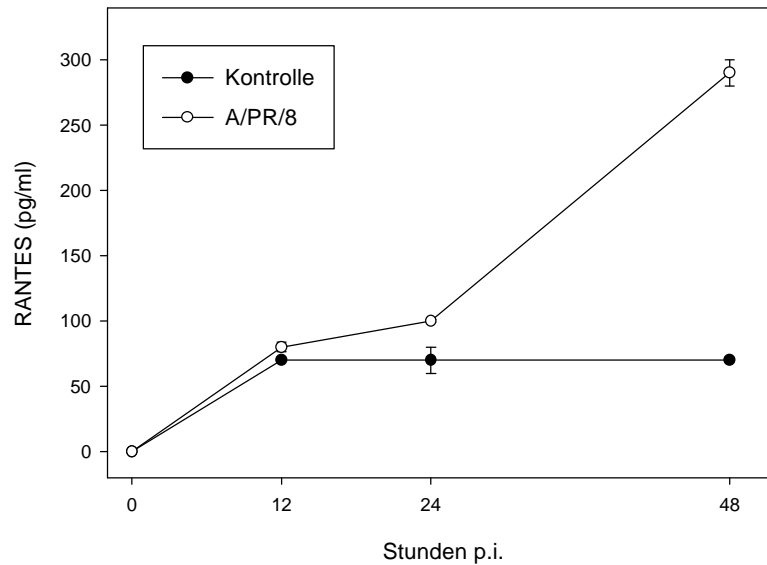


Abb. 32: Kinetik der RANTES-Freisetzung aus bronchiolärem Epithel U1752. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

Die normalen, humanen Bronchialepithelien zeigten eine geringe, konstitutive Sekretion von RANTES, die um 100 pg/ml lag, aber nicht durch die Infektion beeinflusst werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.6.2.2. MCP-1

Das auf Monozyten stark attrahierend und aktivierend wirkende Chemokin MCP-1 konnte zwar bei beiden Zelllinien nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich eine Beeinflussung der sezernierten Spiegel lediglich bei infizierten alveolären Zellen; die bronchiolären Zellen U1752 blieben unverändert bei einer geringen freigesetzten MCP-1-Menge von etwa 80 pg/ml.

Abb. 33 stellt die Sekretion von MCP-1 aus infizierten A549-Zellen dar und lässt bereits nach 12 h p.i. einen Anstieg des Spiegels (1800 pg/ml) im Vergleich zur mock-infizierten Kontrolle erkennen. Nach 48 Stunden lag die Menge des im ELISA gemessenen MCP-1 bei 5000 pg/ml. In Abbildung 34 ist die durch die Virusinfektion unbeeinflusste, sehr geringe konstitutive Freisetzung von MCP-1 aus den bronchiolären Zellen U1752 dargestellt.

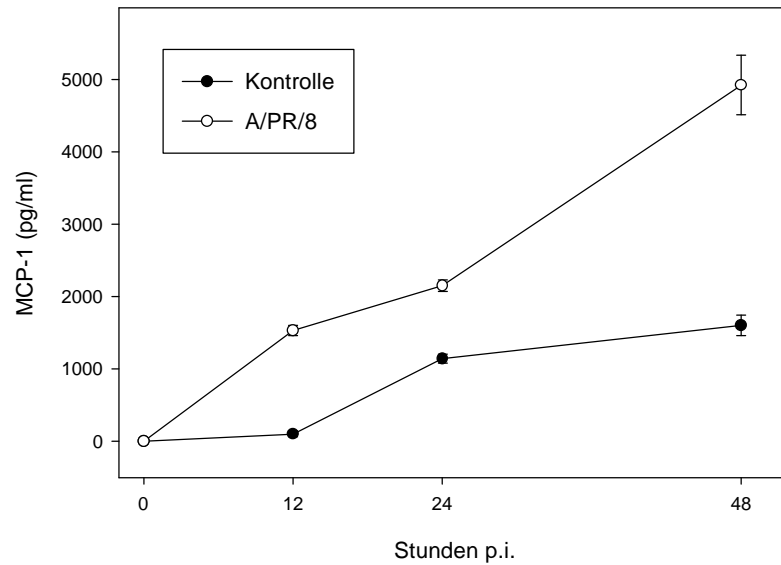


Abb. 33: Kinetik der MCP-1-Freisetzung aus alveolärem Epithel A549. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

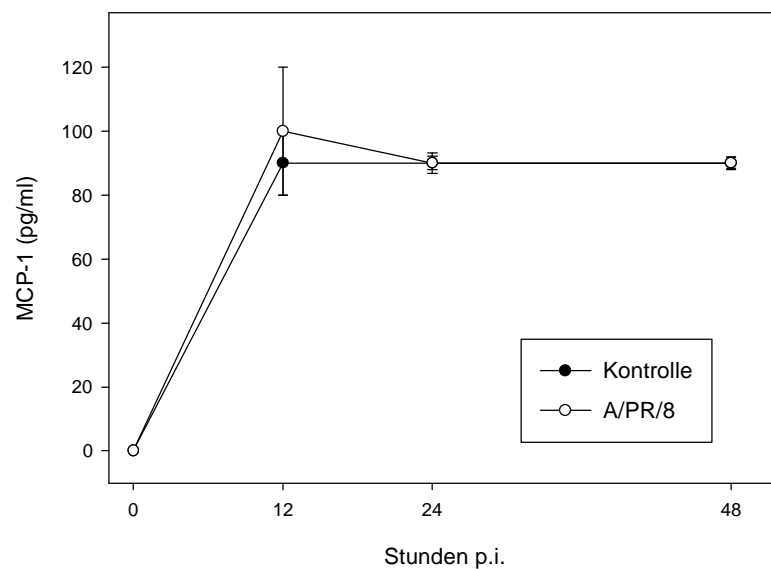


Abb. 34: Kinetik der MCP-1-Freisetzung aus bronchiolärem Epithel U1752. Die Zellen wurden mit 2 MOI Influenza A-Virus A/PR/8/34 infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

Die NHBE-Zellen zeigten keinerlei Freisetzung des Proteins MCP-1.

3.6.2.3. MIP-1 α

Alle untersuchten Zelltypen zeigten eine geringe, aber von der Infektion mit Influenza A-Viren unbeeinflusste, konstitutive Sekretion von 100-300 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

3.6.3. Darstellung der Chemokin-mRNA in A549-, U1752-Zellen und in primären Bronchialepithelzellen NHBE mittels PCR

Nachdem die Chemokine IL-8, GRO- α und RANTES als Protein nachgewiesen wurden, stellt sich die Frage nach der Expression und einer möglichen Regulation durch die Influenza A-Virusinfektion. Dazu wurde Gesamt-RNA zu mehreren Zeitpunkten nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 (0h, 2h, 4h p.i.) gewonnen, in cDNA umgeschrieben und in die semiquantitative PCR für die verschiedenen Chemokine eingesetzt. Die eingesetzte Menge an RNA wurde in einer PCR für GAPDH kontrolliert.

In Abbildung 35 sind die entsprechenden PCR-Daten für A549- und U1752-Zellen dargestellt:

IL-8 konnte in geringer konstitutiver Expression in alveolären Zellen nachgewiesen werden und war 4 Stunden p.i. deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht; eine Induktion des IL-8-Gens durch die Infektion konnte ebenfalls bei den bronchiolären Zellen U1752 4h p.i. festgestellt werden.

Auch für das CXC-Chemokin GRO- α wurde die Hochregulierung der mRNA-Expression durch die Infektion nachgewiesen; 2 Stunden p.i. war die mRNA bei infizierten A549-Zellen zwar nur unwesentlich, aber nach 4h p.i. doch deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Die gleichen Ergebnisse ergaben sich für U1752-Zellen: die Transkription für das GRO- α -Gen war nach Infektion hochreguliert.

Auch der Nachweis für eine durch A/PR/8/34-Infektion hochregulierte mRNA-Produktion für RANTES konnte in beiden eingesetzten Zelllinien A549 und U1752 geführt werden und ist in Abbildung 35 dargestellt.

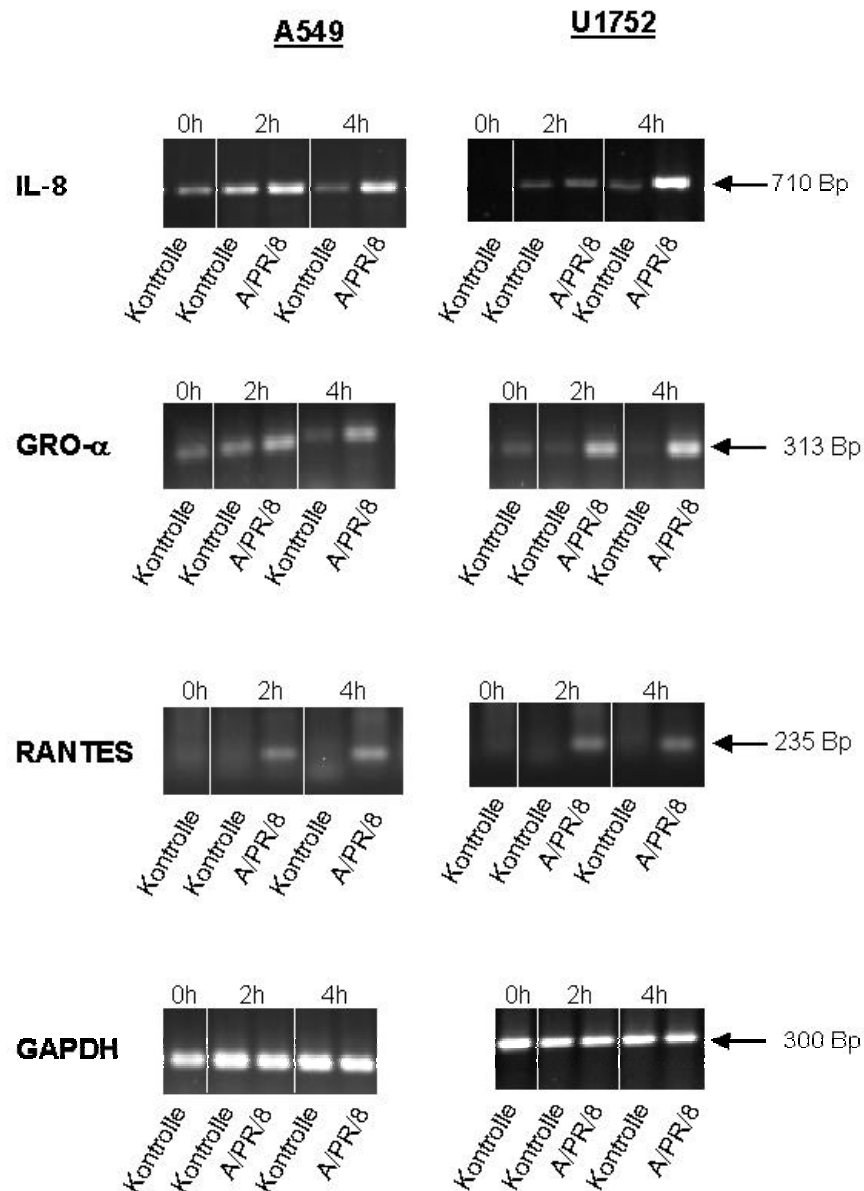


Abb.35: Spezifische PCRs zeigen die Expression der mRNA für die CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α und für das CC-Chemokine RANTES in den Zelllinien A549 und U1752. Die Zellen wurden mock-infiziert oder mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert und die Gesamt-RNA nach 0, 2 und 4 Stunden p.i. gewonnen. Jeweils 2 μ g Gesamt-RNA wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt. Das für das zu untersuchende Chemokin spezifische Primerpaar wurde mit jeweils 1 μ l des vorangegangenen cDNA-Syntheseansatzes in die PCR eingesetzt. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge wurde eine PCR für GAPDH mitgeführt.

Die Abbildung 36 zeigt die in normalen, humanen Bronchialepithelzellen ebenfalls hochregulierte mRNA für die Chemokine IL-8, GRO- α , RANTES und MIP-1 α ; die Kontrolle der semiquantitativen PCR erfolgte hier ebenfalls über die PCR für das „Housekeeping-Gen“ GAPDH.

Für das auch als sezerniertes Protein nachgewiesene CXC-Chemokin IL-8 konnte eine geringe Hochregulation des IL-8-Gens bei infizierten Zellen gegenüber der Kontrolle gezeigt werden. Die mRNA blieb bis 48 Stunden p.i. stabil exprimiert.

Auch die Transkription des Gens für GRO- α war noch nach 48 Stunden p.i. nachweisbar.

RANTES-mRNA dagegen war bis 24h p.i. exprimiert und war nach 48 Stunden p.i. nicht mehr nachweisbar.

Für das zweite untersuchte CC-Chemokin MIP-1 α konnte bis 24 Stunden nach der Infektion mit A/PR/8/34 keine mRNA nachgewiesen werden, erst 48h p.i. wurde die Transkription für das Gen nachgewiesen.

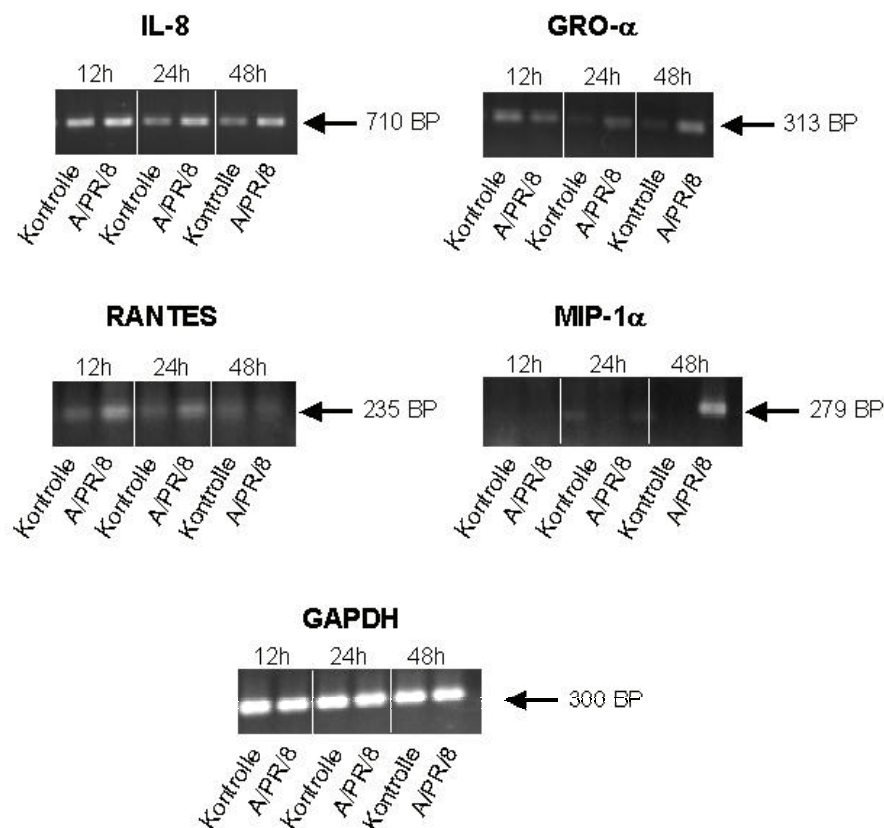


Abb.36 zeigt die in Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) nachgewiesenen mRNAs für die CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α und die CC-Chemokine RANTES und MIP-1 α in normalen humanen bronchiolären Epithelzellen (NHBE). Die Zellen wurden mock-infiziert oder mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert und die Gesamt-RNA nach 12, 24 und 48 Stunden p.i. gewonnen. Jeweils 2 μ g Gesamt-RNA wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt. Das für das zu untersuchende Chemokin spezifische Primerpaar wurde mit jeweils 1 μ l des vorangegangenen cDNA-Syntheseansatzes in die PCR eingesetzt. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge wurde eine PCR für GAPDH mitgeführt.

3.7. Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-10 aus Influenza A-virusinfiziertem Lungenepithel

Bei den Zelllinien A549 und U1752 konnte keines der oben genannten Zytokine im konditionierten Zellüberstand mittels ELISA festgestellt werden.

Lediglich in normalen humanen Bronchialepithelzellen NHBE war eine Freisetzung von TNF- α nachweisbar, die nach 72h in den infizierten Zellen (670 pg/ml) ganz leicht gegenüber der Kontrolle (510 pg/ml) erhöht war. Nach 96h p.i. lag der TNF- α -Gehalt des Kontrollüberstandes bei 500 pg/ml, der Gehalt des infizierten Zellüberstandes bei 1000 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

Die proinflammatorisch wirksamen Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-6 waren auch in primären Zellen nicht nachweisbar, ebenso wenig das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10.

3.8. Vorbehandlung der Lungenepithelzellen mit TNF- α und mit Interleukin-1 β

Chemokine der CC- und CXC-Familie sind, wie erwähnt, in vielen Geweben induzierbar (Baggiolini et al., 1994). Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 β sind dabei als gute Induktoren bekannt und wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur 4-stündigen Vorbehandlung der Lungenepithelzellen eingesetzt, die anschließend mit Influenza Virus A/PR/8 in üblicher Weise infiziert wurden.

3.8.1. Vorbehandlung mit TNF- α induziert Chemokinsekretion

Die Vorbehandlung mit TNF- α zeigte bei den untersuchten Zellen A549 und U1752 keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen im Zeitraum der Vorbehandlung und der anschließenden Infektion (A/PR/8/34) oder Mock-Infektion über 24 Stunden.

Beide Zelllinien (A549 und U1752) zeigten nach 4-stündiger Vorbehandlung mit 20 ng/ml TNF- α und weiterer Inkubation über 24 Stunden eine signifikante Induktion und Freisetzung der untersuchten CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α , sowie des CC-Chemokins MCP-1; die der Inkubation mit TNF- α nachfolgende Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 über 24 Stunden erbrachte keinen Unterschied in der Menge der sezernierten Chemokine (Abbildung 37a-c: A549-Zellen; Abbildung 38a-c: U1752-Zellen).

Dahingegen war das Verhalten im Bezug auf das außerdem untersuchte CC-Chemokin RANTES bei beiden Zelllinien nach einer zusätzlichen Infektion anders als bei der voranstehenden IL-8, GRO- α und MCP-1: die alveolären Zellen A549 zeigten eine leichte Erhöhung der RANTES-Spiegel durch TNF- α allein (1000 pg/ml), die Infektion mit A/PR/8/34 potenzierte diese Menge auf über 6000 pg/ml Abb. 37d).

Bei den bronchiolären Zellen konnten diese Verhältnisse in ähnlicher Weise, aber bei niedrigeren Chemokin-Spiegeln nachgewiesen werden (Abb. 38d).

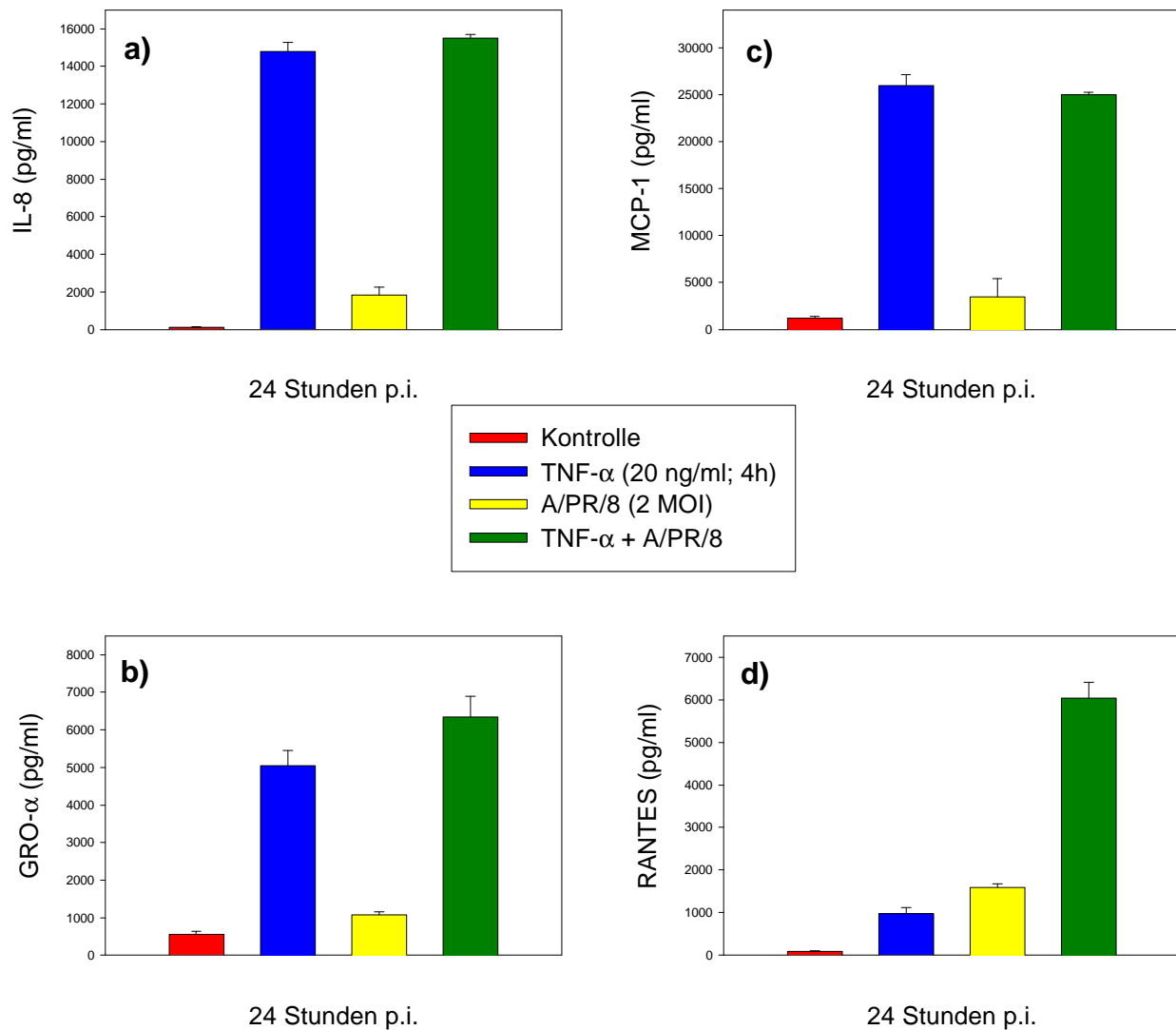


Abb.37 gibt die Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8, MCP-1, GRO-α und RANTES wieder.

Die alveolären Zellen A549 wurden 4 Stunden mit 20 ng/ml TNF-α inkubiert, dann mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert oder mock-infiziert und über 24h bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden danach abgenommen, abzentrifugiert und im entsprechenden ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

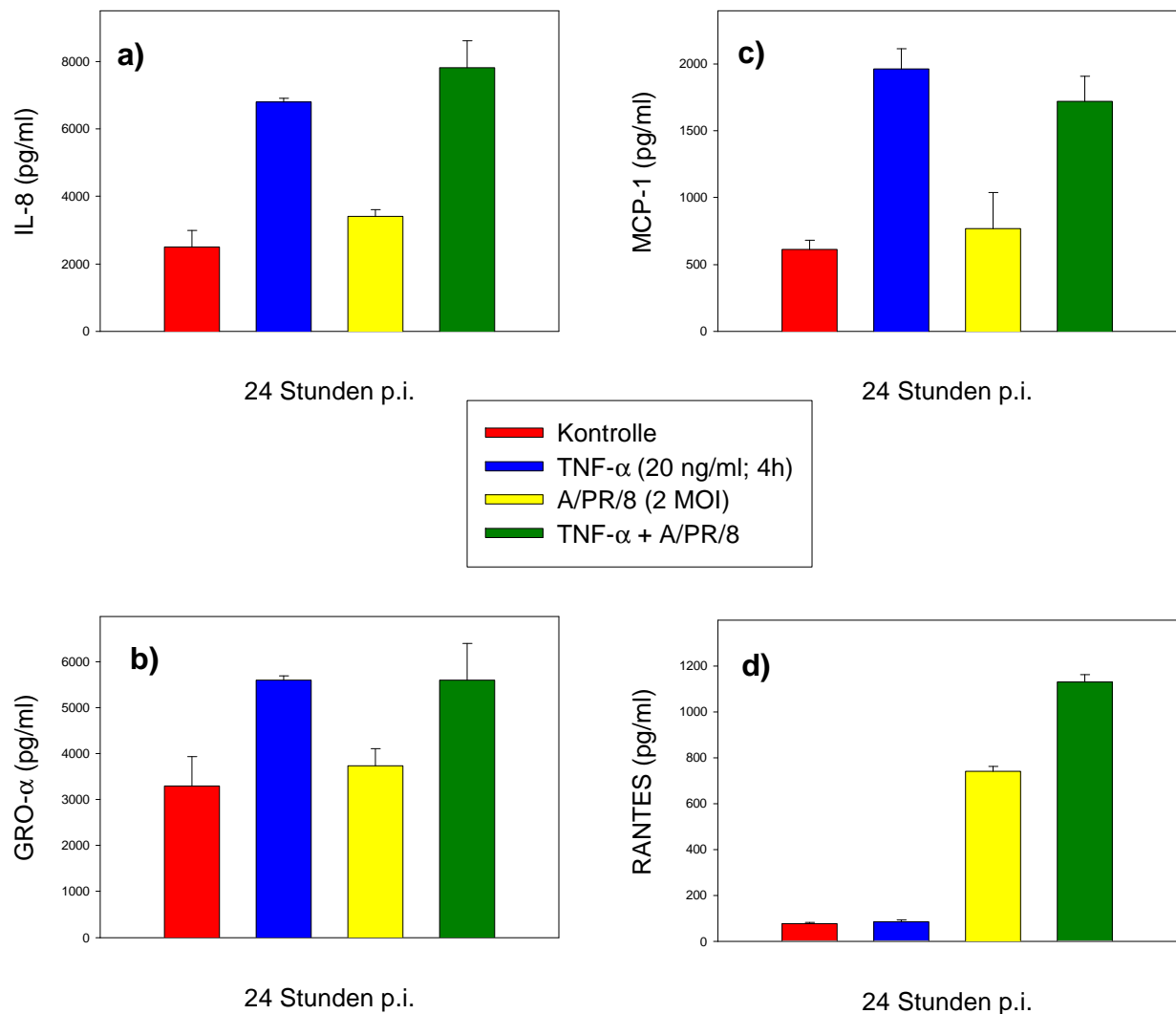


Abb.38 gibt die Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8, MCP-1, GRO- α und RANTES wieder. Die bronchiolären Zellen U1752 wurden 4 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert, dann mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert oder mock-infiziert und über 24h bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden danach abgenommen, abzentrifugiert und im entsprechenden ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

Eine Vorbehandlung mit TNF- α konnte bei beiden Zellen keine Freisetzung von MIF induzieren (Daten nicht gezeigt).

3.8.2. Vorbehandlung mit IL-1 β führt in Lungenepithelzellen zur Induktion von MxA-Proteinen und zur Freisetzung von Chemokinen

3.8.2.1. IL-1 β schützt die Zellen vor Influenza A-Virusinfektion

Die mikroskopische Begutachtung der Zellen A549 und U1752 nach Inkubation mit 10 ng/ml Interleukin-1 β und die anschließende Infektion mit A/PR/8/34 erbrachte das folgende Ergebnis:

Nur sehr wenige der Zellen, die 4 Stunden vor der Infektion (2 MOI A/PR/8/34) mit IL-1 β vorbehandelt wurden, waren infiziert; das bedeutet, daß IL-1 β die Infektion verhindern konnte. Die Abbildungen 39 und 40 zeigen die alveolären Zellen A549 bzw. die bronchiolären Zellen U1752. Die jeweilige Abb.A stellt die mock-infizierten Zellen dar, Abb.B die mit 2 MOI A/PR/8/34 infizierten Zellen, Abb.C die IL-1 β -vorbehandelten Zellen und die Abb. 39D bzw. Abb. 40D die vorbehandelten und zusätzlich infizierten Zellen.

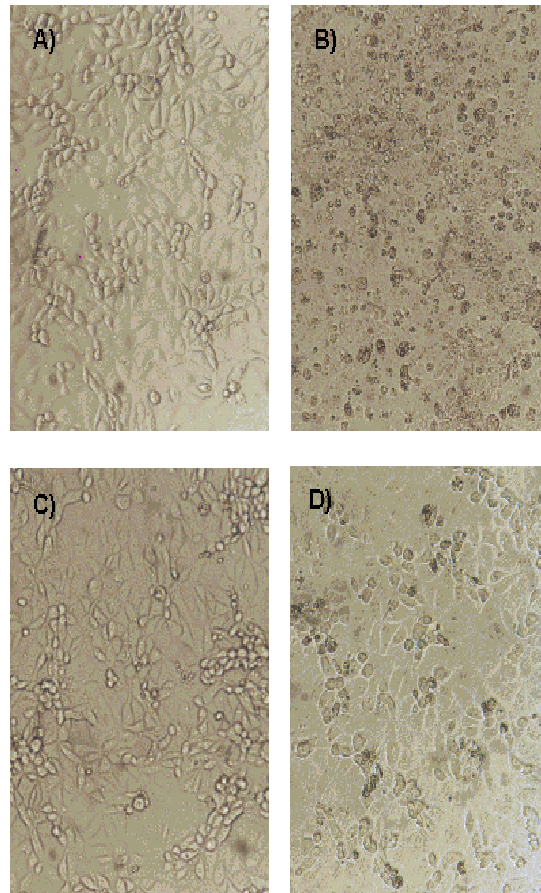


Abb.39 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von alveolären Zellen (A549), die über 24 Stunden unbehandelt blieben (A), die mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert wurden (B), die 4 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 β vorbehandelt wurden (C) oder nach der IL-1 β -Vorbehandlung mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert wurden (D).

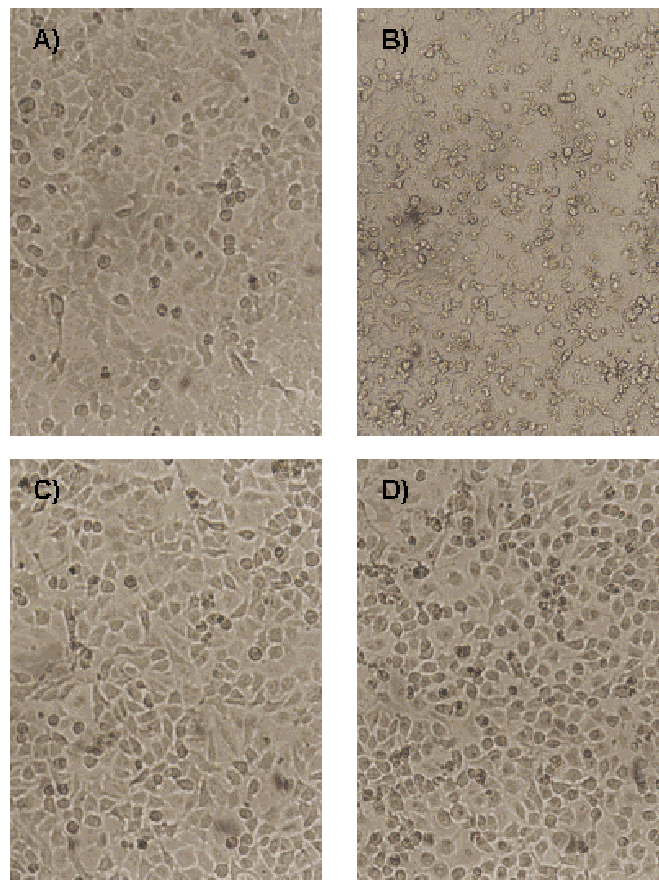


Abb.40 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von bronchiolären Zellen (U1752), die über 24 Stunden unbehandelt blieben (A), die mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert wurden (B), die 4 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 β vorbehandelt wurden (C) oder nach der IL-1 β -Vorbehandlung mit 2 MOI A/PR/8/34 infiziert wurden (D).

3.8.2.2. Induziert IL-1 β Interferon α/β oder Mx-Proteine?

3.8.2.2.1. Interferon α/β

Diese oben vorgestellte Beobachtung warf natürlich die Frage auf, über welchen Mechanismus diese offensichtliche Protektion begründet sein könnte. Eine Induktion von Interferon- α und- β durch IL-1 β wäre eine Erklärung für die virusprotektive Wirkung und so wurden beide Interferone im ELISA untersucht. Das Ergebnis war negativ, das heißt, es konnte keine Induktion von IFN- α/β durch IL-1 β (untersuchte Zeitpunkte: 4h und 40h) mittels der eingesetzten ELISAs nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen für IFN- α lagen bei

15,6 pg/ml, die für IFN- β bei 3,15 IU/ml (Daten nicht gezeigt). Allerdings gelang der Nachweis der mRNA-Induktion für IFN- β nach IL-1 β -Behandlung in einer semiquantitativen PCR (Daten nicht gezeigt).

Dennoch war folgender Unterschied festzustellen: die IL-1 β -vorbehandelten, infizierten Zellen zeigten gegenüber den unbehandelten, infizierten Zellen eine um die Hälfte niedrigere Freisetzung von Interferon- α/β . Beispielsweise waren 40 Stunden p.i. im Überstand unbehandelter, infizierter U1752-Zellen 56,3 IU/ml (MW \pm SD 2,9), im Überstand von IL-1 β -vorbehandelten, infizierten Zellen lediglich 26,5 IU/ml (MW \pm SD 2,6). Indirekt konnte so der oben beschriebene Effekt bestätigt werden.

3.8.2.2.2. MxA-Induktion

Die zweite in Erwägung gezogene Erklärung war die direkte Induktion von Mx-Proteinen durch Interleukin-1 β . Das Mx-Protein zählt zu der Dynamin-Superfamilie der GTPasen mit hohem Molekulargewicht und erzeugt hochspezifisch Resistenz gegenüber Influenza A-Viren. Beim Menschen unterscheidet man zwei Proteine, die als MxA und MxB bezeichnet werden.

Um eine Induktion von MxA zu untersuchen, wurde ein für MxA spezifisches Primerpaar hergestellt und in der PCR eingesetzt.

Nach 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml Interleukin-1 β konnte die spezifische Bande für MxA-mRNA in einer semiquantitativen PCR nachgewiesen werden, beispielhaft für U1752-Zellen in der Abbildung 41a dargestellt. Abbildung 41b zeigt die Situation 2 Stunden und 4 Stunden nach der Infektion, nachdem vor Beginn der Infektion 4 Stunden mit IL-1 β vorinkubiert wurde. Parallel dazu wurde die mRNA mock-infizierter und A/PR/8/34-infizierter, nicht vorbehandelter Zellen untersucht. Die MxA-Induktion durch Virus allein war bei 4h p.i. nachweisbar, die Kombination von IL-1 β -Behandlung und Infektion zeigte keinen quantitativen Unterschied zu IL-1 β -Vorbehandlung oder virusinduziertem MxA allein.

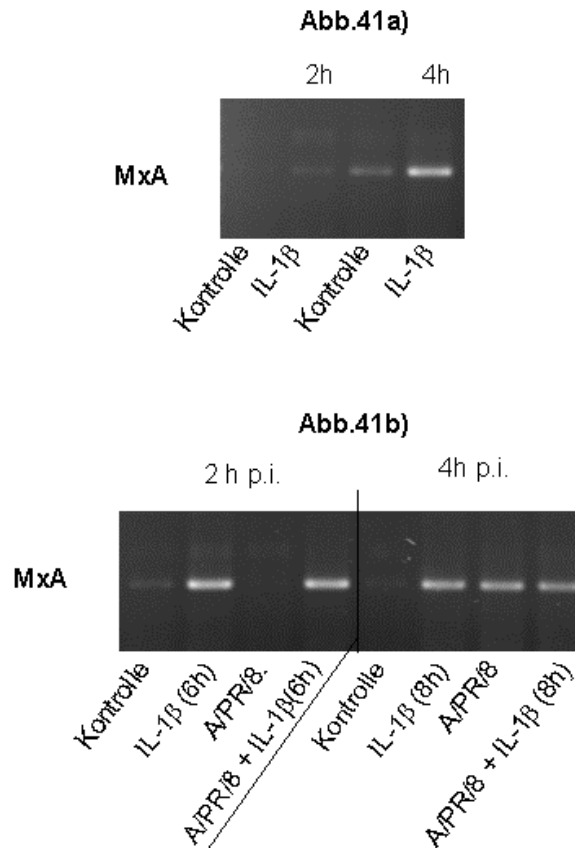
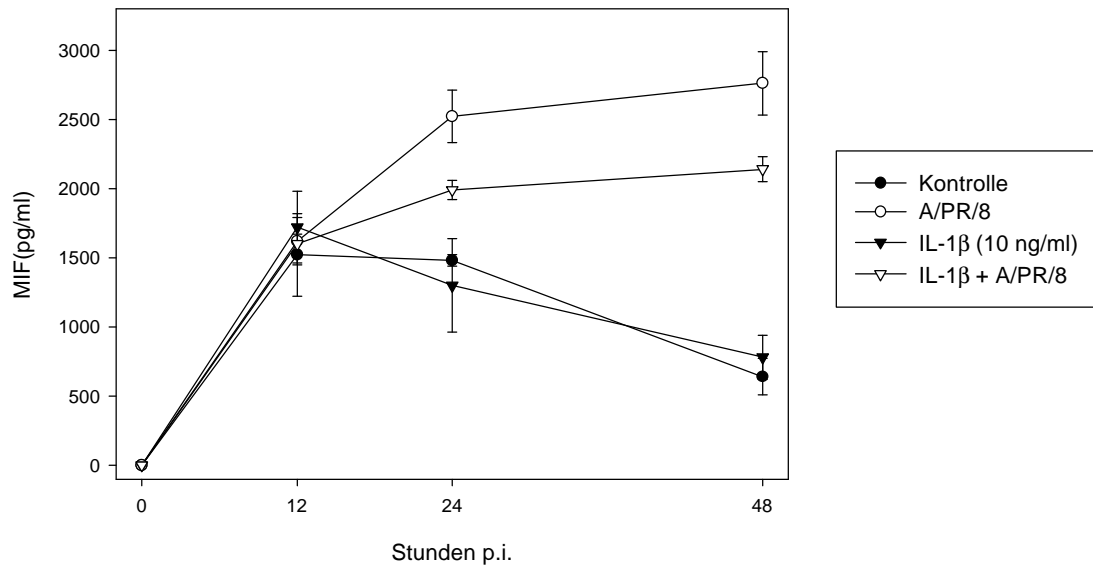
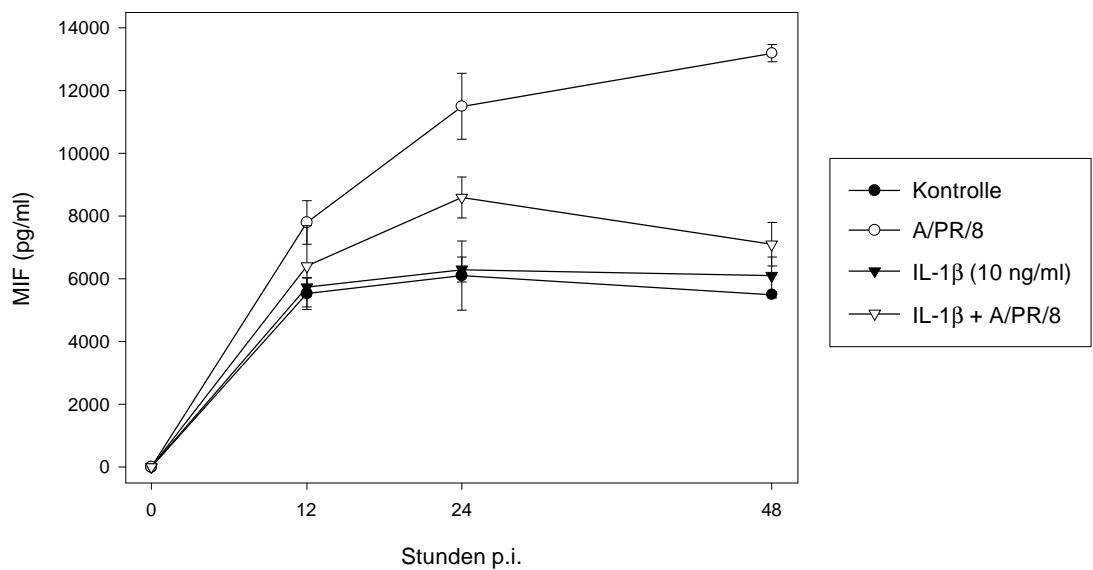


Abb.41: mRNA für MxA-Protein konnte mit Hilfe einer PCR nachgewiesen werden. Dazu wurde Gesamt-RNA von U1752-Zellen 2 oder 4h p.i. gewonnen, jeweils 2 μ g in cDNA umgeschrieben und davon wiederum 1 μ l in der PCR eingesetzt. Die gewählten Primer amplifizierten ein DNA-Fragment von 244 Bp Länge.

3.8.2.3. Einfluß einer IL-1 β -Vorbehandlung auf die Freisetzung von MIF

Das Ergebnis einer IL-1 β -Vorbehandlung auf die Freisetzung von MIF erwies sich als schlüssig mit den voranstehenden Ergebnissen und dem Wissen, daß MIF aus nekrotischen Zellen (durch die Infektion mit Influenza A-Viren) freigesetzt wird. Die Abbildungen 42a (A549) und 42b (U1752) zeigen übereinstimmend eine partiell supprimierte Freisetzung von MIF, wenn die Zellen vor Infektion mit A/PR/8/34 mit IL-1 β vorbehandelt worden waren, also ein gewisser protektiver Effekt durch MxA-Induktion erreicht wurde.

Die IL-1 β -Vorbehandlung hat keinerlei Einfluß auf die MIF-Sekretion.

Abb.42a:**Abb.42b:**Abb 42: Kinetik der MIF-Freisetzung nach Vorbehandlung mit rekombinantem IL-1 β (10 ng/ml).

Die Behandlung (Abb.a: A549-Zellen; Abb.b: U1752-Zellen) wurde 4 Stunden vor einer Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 begonnen und entsprechend des gewählten Zeitpunktes der Kinetik fortgeführt. Parallel wurden eine unbehandelte Kontrolle, ein IL-1 β -behandelter Ansatz und eine Infektion ohne vorherige IL-1 β -Behandlung gewählt.

3.8.2.4. Chemokininduktion in Lungenepithelien nach IL-1 β -Behandlung

Die CXC-Chemokine IL-8 (Abbildungen 43 a/b) und GRO- α (Abbildungen 44 a/b) wurden in den beiden Zelllinien allein durch eine IL-1 β -Behandlung (10 ng/ml über 4 Stunden, je ein Ansatz mit anschließender Infektion über 24h) induziert und freigesetzt. Das entsprechende Ergebnis ergab sich auch bei dem Monozyten attrahierenden CC-Chemokin MCP-1 (Abbildungen 45 a/b). Eine zusätzliche Infektion mit A/PR/8/34 beeinflusste nicht den Verlauf und die Höhe der Freisetzung den genannten Chemokine.

Die primären Bronchialepithelien zeigten eine signifikante Induktion der CXC-Chemokine IL-8 (Abb. 43c) und GRO- α (Abb. 44c), wobei GRO- α bereits eine Basalsekretion aufwies (2000-2500 pg/ml), die durch IL-1 β -Behandlung etwa vervierfacht wurde. Bei diesen Versuchen wurden die primären Zellen nicht zusätzlich mit A/PR/8/34 infiziert; es wird auf die Darstellung in Abb.28 verwiesen.

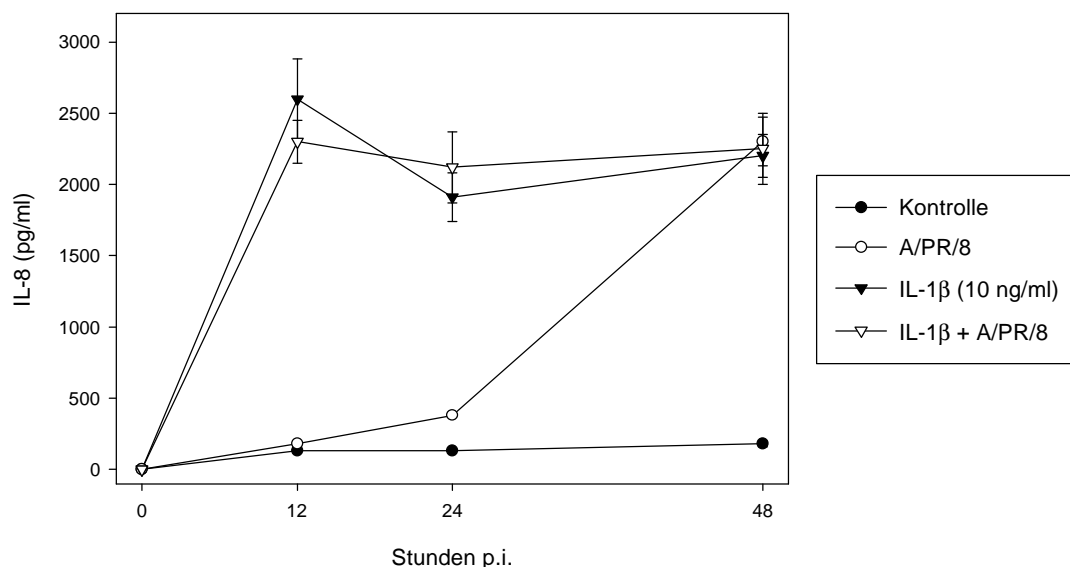


Abb.43a: Kinetik der IL-8-Sekretion bei A549-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

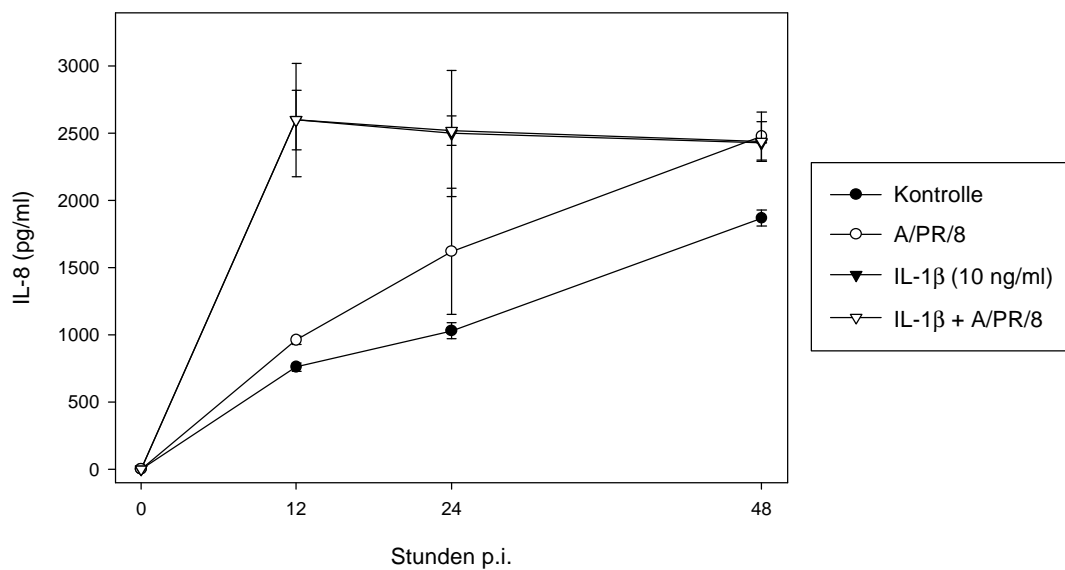


Abb.43b: Kinetik der IL-8-Sekretion bei U1752-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

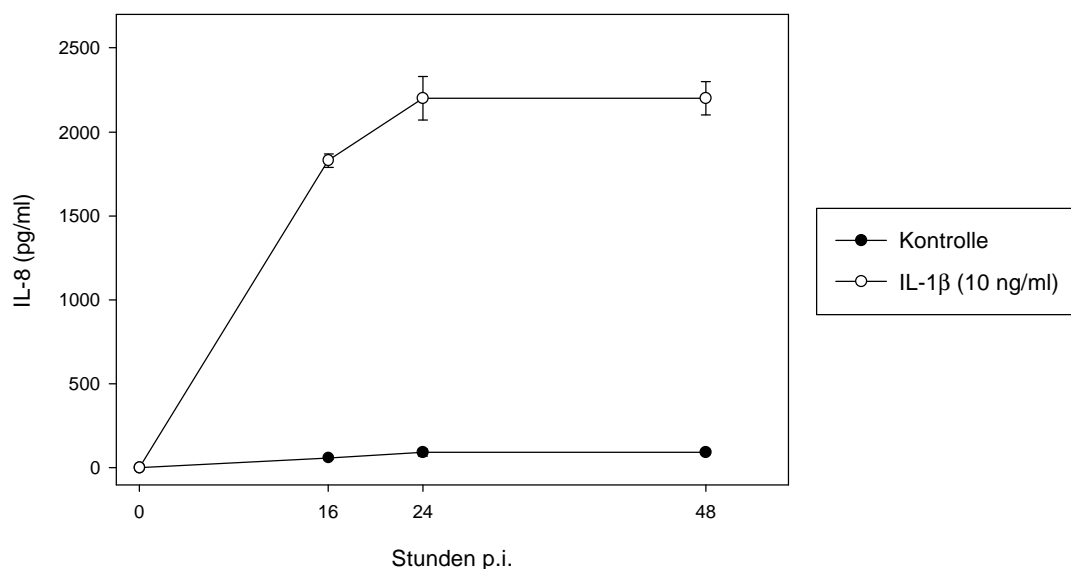


Abb.44c: Kinetik der IL-8-Sekretion bei primären Bronchialepithelzellen (NHBE) nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β . Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Doppelbestimmung durchgeführt wurde. In diesem Versuch wurde nicht zusätzlich mit A/PR/8/34 infiziert, es wird aber auf die Abb.28 verwiesen.

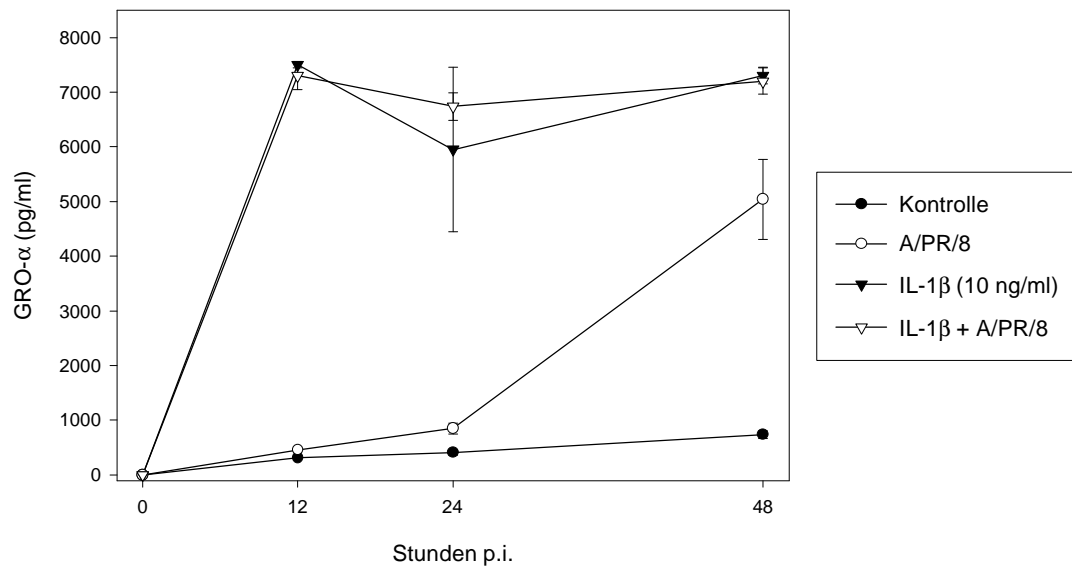


Abb.44a: Kinetik der GRO- α -Sekretion bei A549-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

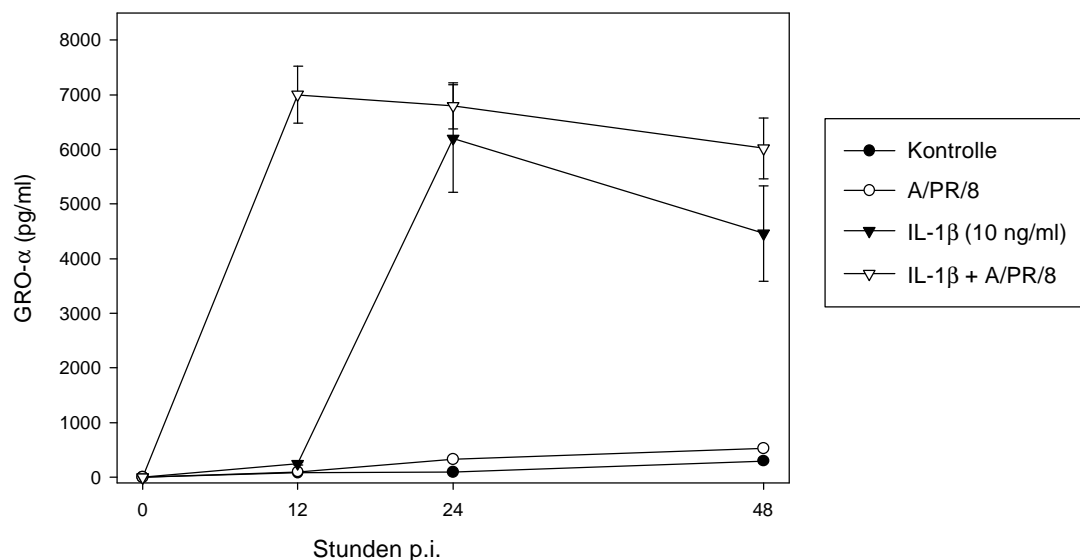


Abb.44b: Kinetik der GRO- α -Sekretion bei U1752-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

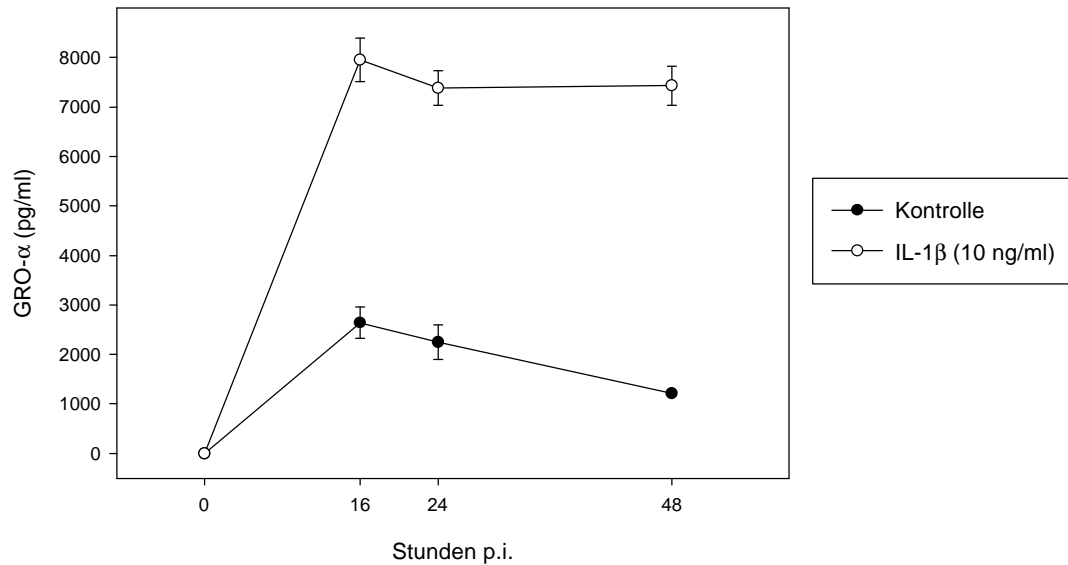


Abb.44c: Kinetik der GRO- α -Sekretion bei primären Bronchialepithelzellen (NHBE) nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β . Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Doppelbestimmung durchgeführt wurde. In diesem Versuch wurde nicht zusätzlich mit A/PR/8/34 infiziert, es wird aber auf die Abb.28 verwiesen.

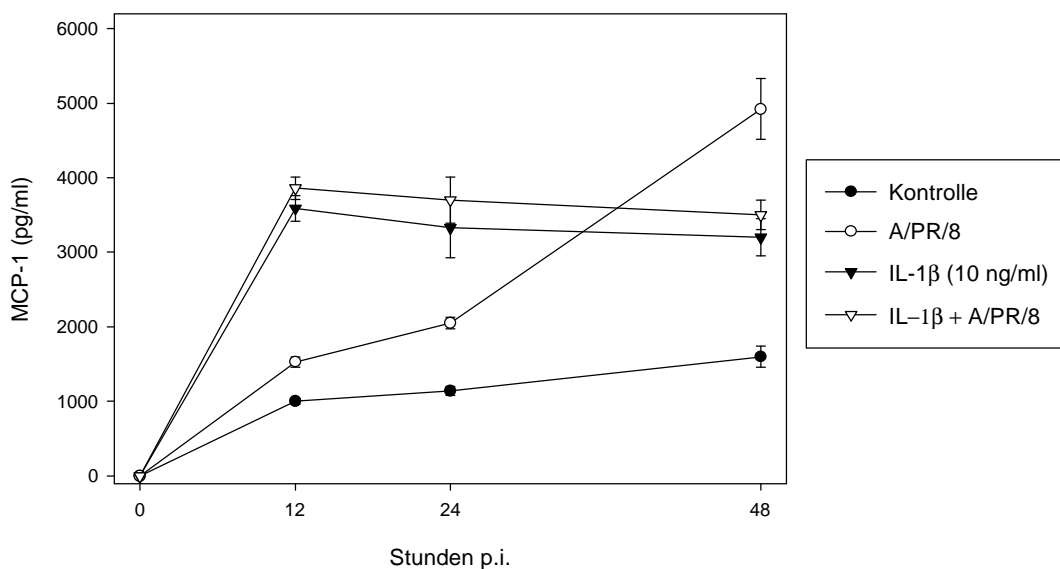


Abb.45a: Kinetik der MCP-1-Sekretion bei A549-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

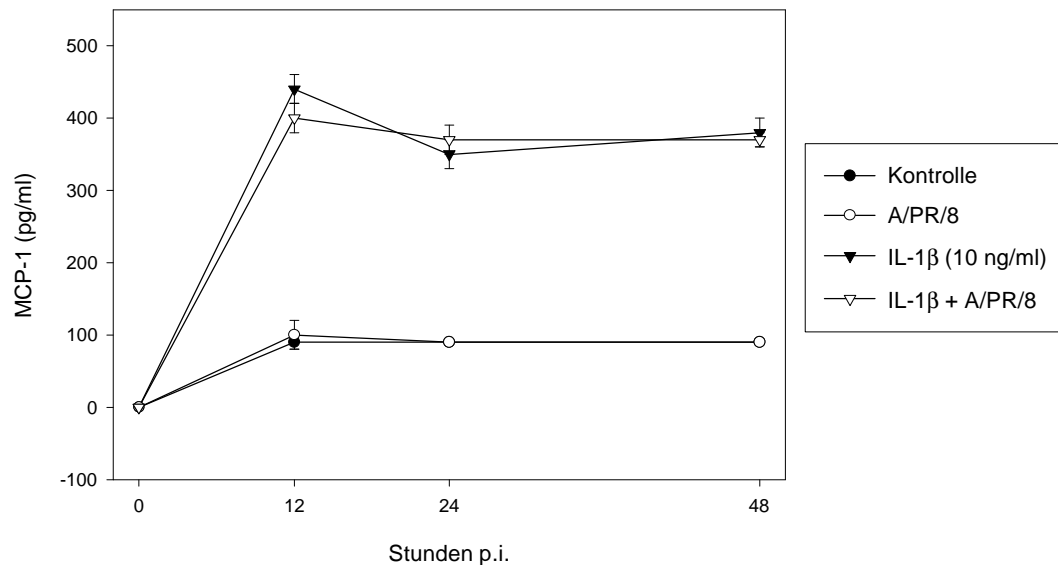


Abb.45b: Kinetik der MCP-1-Sekretion bei U1752-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde

Das CC-Chemokin RANTES zeigte dagegen ein anderes Verhalten: die alveolären Zellen A549 wurden durch IL-1 β zur Sekretion von RANTES angeregt (Abbildung 46a), die bronchiolären Zellen zeigten auf IL-1 β allein keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 46b). A549-Zellen waren aber unter der zusätzlichen A/PR/8/34-Infektion zur Sekretion signifikant höherer Spiegel in der Lage. Vergleicht man die RANTES-Freisetzung, die nach Infektion ohne IL-1 β -Vorbehandlung gemessen wurde, so wird deutlich, daß die Infektion allein für die erhöhten Spiegel verantwortlich ist, also kein additiver oder synergistischer Effekt vorliegt.

Dahingegen scheint die Freisetzung von RANTES aus U1752-Zellen nach Infektion supprimiert, wenn 4 Stunden vor der Infektion mit IL-1 β behandelt wurde (Abb. 46b).

Bei normalen humanen Bronchialepithelien (NHBE) konnten die CC-Chemokine MCP-1 und RANTES durch Behandlung mit IL-1 β nicht induziert werden.

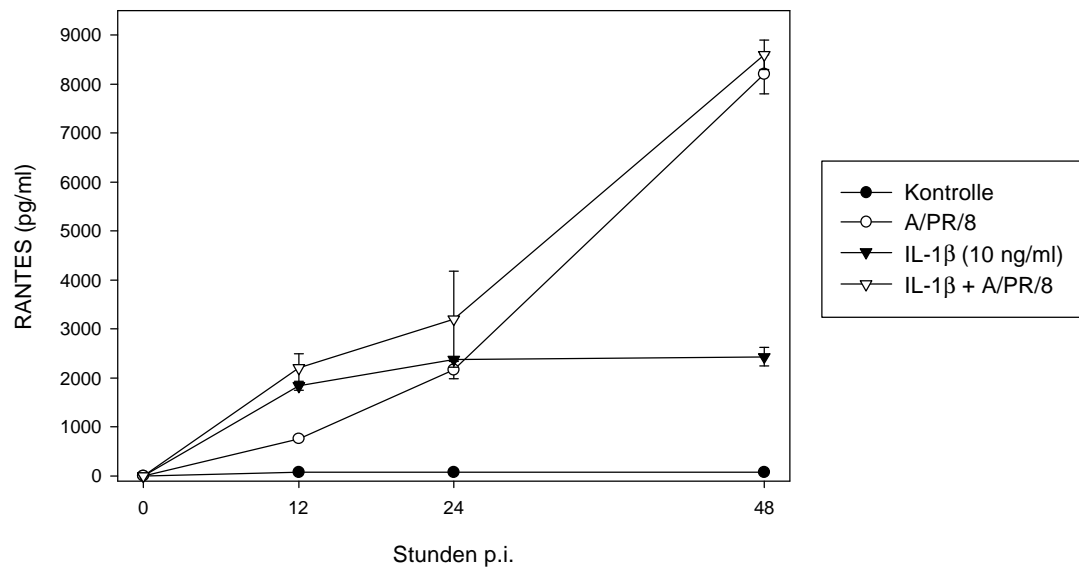


Abb.46a: Kinetik der RANTES-Sekretion A549-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

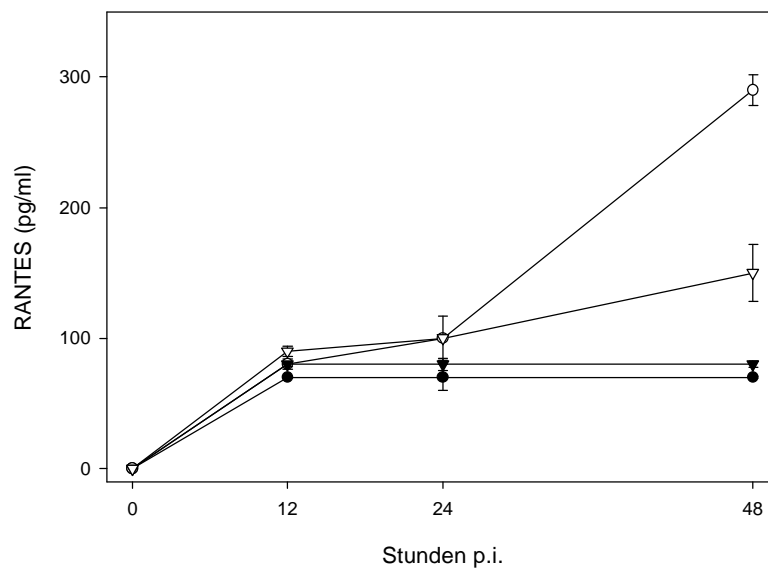


Abb.46b: Kinetik der RANTES-Sekretion U1752-Zellen nach Vorbehandlung mit 10 ng/ml rekombinantem IL-1 β und anschließender Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und im ELISA eingesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) eines Versuchs, der zu jedem Zeitpunkt in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

4. Diskussion

4.1. Nekrose oder Apoptose?

Zellen des Respirationstraktes (Larynx, Trachea, Bronchien) sind die Zielzellen einer Influenza A-Virusinfektion, wobei vor allem die Gewebe des unteren Respirationstraktes massivem Zelltod bis hin zu Hämorrhagien unterliegen. Das histologische Bild zeigt sowohl den Zelluntergang des Flimmerepithels, die Zellen sind vakuolisiert, ödematös und verlieren die Zilien, als auch Infiltrate aus mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten. Bereits einen Tag nach Beginn der Symptomatik setzt eine Desquamation des Flimmerepithels und der schleimproduzierenden Zellen ein (Murphy & Webster; Fields Virology, 1996).

In dieser Arbeit wurden humane alveoläre (A549), bronchioläre (U1752) Zellen und primäre Bronchialepithelzellen (NHBE) als in-vitro-Modell einer Influenza A-Virusinfektion eingesetzt. Eindeutig ist der zytopathische Effekt der Infektion mit dem Influenza A-Virus A/PR/8/34 zu erkennen (Abb. 1 und 2), ebenso konnte die Virusreplikation mittels PCR (Abb. 4) und im Plaquetest (Abb. 5) nachgewiesen werden. Damit können die gewählten Zellsysteme als geeignet virussuszeptibel angesehen werden, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Zellen infiziert und sowohl in den Zelllinien (A549, U1752) als auch in primären Bronchialepithelien wurde durch verschiedene Methoden der Zelluntergang durch Nekrose gezeigt (Annexin-V-Fluoreszenz-Färbung in Abb. 6+7, DNA-Leiter in Abb. 9, TUNEL-Assay). Das steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu einigen anderen Arbeiten, die den Zelltod nach Influenza A-Infektion als Apoptose beschrieben haben (Takizawa et al., 1993; Fesq et al, 1994; Hinshaw et al., 1994; Mori et al., 1995).

Ein Ergebnis ist allerdings davon abhängig, welche Zellen untersucht werden, welcher Virusstamm eingesetzt wird, ob die Infektion *in vivo* oder *in vitro*

stattgefunden hat und sicherlich ist auch die aktuelle Immunlage des untersuchten Organismus von Bedeutung. Takizawa et al. zeigten in MDCK und HeLa-Zellen Apoptose nach Infektion mit Influenza-Virus A/Udorn/72, Hinshaw et al. konnten in einer Vogel-Lymphozytenlinie mit dem Virusstamm A/Turkey/Ontario/7732/66 Apoptose induzieren und untersuchten weitere Virusstämme auf MDCK-Zellen. H. Fesq et al. konnte Apoptose in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8/34 nachweisen. Mori et al. infizierten Mäuse mit A/PR/8/34 und konnten 3 Tage p.i. Apoptose in den Bronchialzellen mittels 'nick end-labelling' *in situ* nachweisen. Andererseits fanden letztere Autoren auch infizierte Zellen, die nicht der virusinduzierten Apoptose unterlagen. Sie stellten zur Diskussion, daß diese Zellen entweder durch einen zusätzlichen, triggernden Effekt später doch apoptotisch werden oder aber im späteren Verlauf der Infektion doch durch nekrotische Vorgänge sterben könnten.

Die in meiner Arbeit untersuchten humanen Zellen, die alveoläre Linie A549, die bronchioläre Linie U1752 und auch die primären Bronchialzellen (NHBE) zeigten alle nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8/34 keine Anzeichen von Apoptose, sondern nur von Nekrose. Die anschaulichste Darstellung nekrotischer Zellen ist die Annexin-V-Fluoreszenzfärbung der infizierten A549-, U1752-Zellen (Abb. 6) als auch der primären Zellen (Abb. 7). In dieser Methode würden apoptotische Zellen lediglich die durch Annexin-V-Fluos markierten, an die äußere Zellmembran translozierten Phosphatidylserine aufweisen. Die Kerngegenfärbung mit Propidiumjodid wäre hier negativ: Propidiumjodid färbt exklusiv den nekrotischen Zellkern an, was sich in den hier untersuchten Zellen auch deutlich zeigen ließ (Abb. 6).

Auch die bekannten histopathologischen Befunde sprechen eher für das Bild einer nekrotisierenden Bronchopneumonie und Inflammation mit Infiltraten bestehend aus mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten (Murphy & Webster; Fields Virology, 1996). Meine Ergebnisse der Nekrose von Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen *in vitro* entsprechen eher diesem histopathologischen Bild eines massiven Entzündungsvorganges, der zwangsläufig durch nekrotisierende Zellen ausgelöst wird. *In vivo* ist Sinn einer Apoptose, den Organismus vor unkontrollierten Entzündungsvorgängen zu

schützen, indem apoptotische Zellen vollständig entfernt werden. Apoptose verläuft kontrolliert ohne Funktions- und Struktureinbußen des betroffenen Gewebes ab (Fesus et al., 1991).

Dies ist bei Infektionen mit Influenza-Viren nicht der Fall; die widersprüchlichen Ergebnisse können wie erwähnt durch Zelltyp, Virusstamm oder andere wechselnde Testparameter zustande kommen. Abhängig von der Infektionsdosis und dem aktuellen Immunstatus des betroffenen Organismus könnte sich aber auch entweder das Bild der Apoptose der Zellen ergeben und die Erkrankung milde oder sogar inapparent verlaufen oder aber, falls sich die Infektion schnell ausbreitet, sich das Vollbild der Erkrankung mit massivem Zelluntergang durch Nekrose, Inflammation und hohem Fieber entwickeln. Vorstellbar wäre auch ein Existieren beider Formen des Zelltodes nebeneinander, wobei bestimmte Stimuli den einen oder anderen Weg triggern und verstärken könnten.

Durchaus vereinbar mit diesem Bild wäre auch die in Monozyten (Fesq et al., 1993 und 1994) und aviären Lymphozyten (Hinshaw et al., 1994) nachgewiesene Apoptose nach Influenza A-Virusinfektion. Es ist sinnvoll, daß Zellen des Immunsystems, die mit Influenza A-Viren infiziert sind, einem kontrollierten, programmierten Zelltod unterliegen und dadurch die Virusreplikation und -ausbreitung durch diese Zellen zumindest reduziert wird.

4.2. Freisetzung von Mediatoren der Inflammation

Körperzellen sind nicht allein das Ziel von Infektionserregern, sondern können auch aktiv durch Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen eine Antwort des Immunsystems auslösen und beeinflussen (Baggiolini et al., 1994).

Zellen des Respirationstraktes sind nach Virusinfektionen in der Lage, Wirkstoffe freizusetzen, die Immunzellen anlocken und aktivieren können. Verschiedene Influenza A-Virusstämme wurden in unterschiedlichen Zellsystemen eingesetzt (Choi et al., 1992, Matsukura et al., 1998), das 'Respiratory syncytial virus' (Noah & Becker, 1993; Becker et al., 1997;

Harrison et al., 1999) wurde ebenso in seiner Rolle der Chemokininduktion untersucht als auch das Rhinovirus (Schroth et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des Makrophagen-Migrations-inhibitions-Faktors (MIF) und von Chemokinen in Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen untersucht. Es ist zu vermuten, daß durch diese Zellen und ihre Reaktion auf die Infektion im Sinne einer Freisetzung der oben genannten Mediatoren der Verlauf einer Infektion beeinflusst wird.

4.2.1. Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF)

MIF wird nicht nur, wie ursprünglich vermutet, in Zellen des Immunsystems exprimiert, sondern auch in sehr vielen Zellen und Geweben des Körpers, so auch in der Lunge. Abbildung 10 zeigt die konstitutive Proteinexpression in normalem humanen Bronchialepithel in einer immunhistochemischen Darstellung.

Die erste beschriebene Eigenschaft von MIF ist seine migrationshemmende Wirkung auf Makrophagen, die 1966 von Bloom & Bennet als auch David (1966) veröffentlicht wurde. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist diese Charakteristik von MIF durchaus relevant. Alle hier untersuchten Zelltypen (A549, U1752 und primäre Bronchialepithelien NHBE) exprimieren konstitutiv MIF (Abb. 11+12) und setzen es 24 bis 48 Stunden nach der Infektion mit A/PR/8/34 frei (Abb. 13, Abb. 14a+b, Abb. 15, Abb. 17). Die Genexpression konnte zusätzlich mittels Northern Blot und PCR gezeigt werden (Abb. 22+23), wobei eine veränderte Expression für das MIF-Gen nach Infektion mit A/PR/8/34 nicht beobachtet werden konnte (Abb. 23+24). Somit gehört das MIF-Gen nicht zu den üblicherweise durch Influenza A Virus-Infektion induzierbaren Genen.

Im Verlauf einer Influenza-Infektion kommt es zu einer Blockierung der zellulären Proteinsynthese, wodurch es zu einem Shift zur Produktion viraler Proteine durch die Wirtszelle kommt. Offensichtlich gibt es einen Unterschied in der Blockierung der wirtseigenen Proteinsynthese: einerseits werden im

Kern neu synthetisierte Transkripte degradiert, vermutlich wird wegen des "cap-stealings" der mRNAs durch das Virus ein Abbau durch zelluläre Endonukleasen begünstigt; andererseits werden Transkripte, die bereits im Zytoplasma der Zelle liegen, nicht durch das Virus degradiert oder modifiziert (Lamb & Krug; Fields Virology, 1996). Da die mRNA für MIF konstitutiv exprimiert wird (Abb. 22), und auch der intrazelluläre Gehalt an MIF-Protein gezeigt werden konnte (Abb. 11+12), bleibt vermutlich die Translation von MIF im Zytoplasma zumindest im frühen Stadium von der Virusinfektion unbeeinflusst.

UV- oder hitzeinaktivierte Viren sind nicht in der Lage, eine MIF-Freisetzung zu induzieren (Abb. 21), das Virus muß also in der Zelle replizieren und aus den Zellen ausknospen, wodurch die Zellen nach gewisser Zeit durch Nekrose zugrunde gehen. Vermutlich wird MIF nicht aktiv sezerniert, sondern wird aus nekrotischen Zellen passiv in die Umgebung freigesetzt. So mußte die Frage nach der Bioaktivität von MIF gestellt werden, denn nur dann wäre MIF eine Funktion in der Immunantwort der hier untersuchten Viruserkrankung zuzuschreiben.

Die Signaltransduktion durch MIF ist in Fibroblasten calciumunabhängig und verläuft über MAP-Kinasen, ist aber in primären Peritubulärzellen (Ratte) calciumabhängig. MIF löst dort die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern aus (Wennemuth et al.; 2000). Die Abbildung 18a veranschaulicht den durch rekombinantes MIF ausgelösten Calciumflux in Rattenstromazellen. Mit einem monoklonalen, gegen MIF gerichteten Antikörper konnte dies spezifisch blockiert werden (Abb. 18b).

Durch die Darstellung der Calciumfluxe, die spezifisch durch MIF aus konditionierten Überständen ausgelöst wurden (alveoläre Zellen A549: Abb. 19a; bronchioläre Zellen U1752: Abb. 19b), konnte die volle Bioaktivität von MIF gezeigt werden; die spezifische Hemmung durch einen monoklonalen Antikörper gegen MIF bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 20). Offensichtlich ist das freigesetzte MIF, auch wenn es aus nekrotisierenden Zellen stammt, funktionsfähig (Abb. 19+20) und wäre *in vivo* in der Lage, die beschriebene Migrationshemmung und andere aktivierende Wirkung auf Leukozyten zu

gewährleisten. Da in histopathologischen Untersuchungen sowohl mononukleäre Zellen als auch Neutrophile gefunden werden, könnten diese immunkompetenten Zellen also durch das freigesetzte und bioaktive MIF sowohl am Infektions- und Entzündungsherd gehalten werden und zusätzlich aktiviert werden.

Bereits 1966 wurde MIF von Bloom & Bennett als auch David eine Rolle in der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ zugewiesen. Weitere Arbeiten boten zumindest Anhaltspunkte dafür, daß MIF von lektin-aktivierten T-Zellen produziert wird und makrophagenaktivierend wirkt, was sich in verstärkter Adhärenz, gesteigerter Phagozytosefähigkeit (Nathan et al, 1971 und 1973) und tumorzerstörender Wirkung (Churchill et al., 1997) äußerte. Diese Arbeiten wurden allerdings in Frage gestellt, da in den eingesetzten Überständen auch weitere Zytokine wie IL-4 und IFN- γ enthalten waren.

Makrophagen sind sowohl als Quelle von MIF beschrieben worden, das nach Stimulation mit LPS, TNF- α und IFN- γ freigesetzt wird, als auch, und das ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, als Zielzellen von MIF (Calandra et al., 1994). Makrophagen, die mit MIF stimuliert wurden, sezernieren TNF- α . Darüberhinaus ist die makrophagenaktivierende Wirkung im Bezug auf die Abtötung von Leishmanien beschrieben worden (Weiser et al., 1991; Jüttner et al., 1998).

Es kann davon ausgegangen werden, daß bioaktives MIF, welches aus Influenza A-virusinfizierten Lungenepithelzellen freigesetzt wird, zur inflammatorischen Antwort im Verlauf der Erkrankung beiträgt, indem es Makrophagen am Entzündungsort hält und diese aktiviert, indem es beispielsweise zur TNF- α -Sekretion anregt.

Influenza A-Virus allein induziert in Monozyten und Makrophagen nur geringe Mengen an TNF- α , erst die zusätzliche Stimulation von LPS bewirkt einen signifikante Anstieg der Freisetzung von TNF- α (Gong et al., 1991; Sprenger et al., 1994). MIF könnte, zusätzlich zur eigenen aktivierenden Wirkung, ähnlich wie LPS, als das zweite, triggernde Signal wirken, das bei Infektionen mit Influenza A-Viren eine Aktivierung von Monozyten bewirkt.

Daß auch neutrophile Granulozyten durch MIF aktiviert werden, wurde bereits von Guthrie et al. (1984) beschrieben; Swope et al. (1998) zeigten dies durch eine MIF-Mutante (Austausch des N-terminalen Prolins gegen Glycin). Diese Autoren benutzten einen sogenannten Neutrophilen-Priming-Assay, in dem humane neutrophile Granulozyten MIF als Priming-Signal erhielten und anschließend mit fMLP stimuliert wurden. Die mit der MIF-Mutante behandelten Zellen wiesen eine um 75% erniedrigte Superoxidproduktion gegenüber den mit Wildtyp-MIF behandelten Neutrophilen auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch MIF auch *in vivo* bei einer Influenza-Infektion stattfindet.

Die negativen Auswirkungen von MIF als Mediator im septischen Schock wurden von mehreren Autoren untersucht (Bernhagen et al., 1993; Bernhagen et al., 1994; Bacher et al., 1997). Exogenes MIF potenziert die Lethalität in einem Maus-Modell der Endotoxämie von 15% auf 85%. Die fatale proinflammatorische Wirkung von MIF kann mit spezifischen Antikörpern blockiert werden.

Ebenso negativ scheint die Rolle von MIF im "acute respiratory stress syndrome" zu sein. Diese entzündliche Erkrankung der Lunge ist gekennzeichnet durch abnormale Neutrophilenaktivität (Warshawski et al., 1986; Christner et al., 1995; Baldwin et al., 1986) und erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α (Suter et al., 1992), IL-8 (Miller et al., 1992) und eben auch MIF (Donnelly et al., 1997). Diese Studie konnte zeigen, daß durch die Blockierung von MIF mit einem monoklonalen Antikörper die Sekretion von TNF- α und IL-8 aus den Zellen bronchiolärer Lavagen (BAL) von ARDS-Patienten signifikant reduziert werden konnte.

In der Rolle als Mediator der proinflammatorischen Antwort wäre es denkbar, daß MIF auch im Verlauf einer Infektion mit Influenza A-Viren zu einer überschießenden, entzündlichen Reaktion beiträgt, indem neutrophile Granulozyten und Makrophagen über das Maß einer benefiziären Inflammation hinaus aktiviert werden.

Bei Infektionen mit Influenza A-Viren ist eine spezifische Immunantwort erforderlich. Um eine Elimination des Erregers zu gewährleisten, ist diese

Reaktion in weiten Teilen von der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen abhängig. In einer Studie von 1996 untersuchte M. Bacher et al. die Rolle von MIF in der T-Zell-Aktivierung (frisch isolierte humane T-Zellen, Milz-T-Zellen von Balb/c-Mäusen; Effekte *in vivo*: Balb(c-Mäuse). Stimulierte T-Zellen können *in vitro* durch MIF-Antikörper in der Proliferation und in der IL-2-Sekretion gehemmt werden. Ebenso konnte *in vivo* gezeigt werden, daß MIF-Antikörper sowohl die antigeninduzierte T-Zell-Aktivierung als auch die Antikörperproduktion unterdrücken. Diese Ergebnisse weisen MIF als ein Zytokin aus, welches die T-Zell-Aktivierung, IL-2-Produktion und Proliferation beeinflusst und die Vermutung liegt nahe, daß MIF auch bei Influenza-Infektionen in der spezifischen Immunantwort der T-Zellen involviert ist und dadurch indirekt auch auf die B-Zell-Aktivierung einwirkt.

4.2.2. Chemokine

Daß neutrophile Granulozyten bei einer Virusinfektion im entzündlichen Infiltrat zu finden sind, ist zunächst nicht einsichtig, da sich nach allgemeiner Pathologen-Ansicht virusinfizierte Gewebe durch einen Immigration von mononuklearen Zellen auszeichnen. Nun konnte im Rahmen meiner Arbeit eine Sekretion von IL-8 nachgewiesen werden; in allen untersuchten Zellen (A549, U1752 und NHBE) wurde eine Ausschüttung dieses neutrophilenattrahierenden Zytokins gefunden (Abb. 26, 27, 28). Somit könnten die Zielzellen der Infektion *in vivo* eine Quelle des sezernierten Interleukin-8 sein, womit die Anwesenheit der Neutrophilen erklärt werden kann. Dieser Aspekt ist in sofern nicht uninteressant, als daß im Laufe der Evolution die Produktion und Freisetzung dieses Zytokins sich als sinnvoll erwiesen haben könnte: ist doch das infizierte Epithel der Atemwege besonders empfänglich für bakterielle Superinfektionen. Besonders Pneumokokken und *Hämophilus influenzae*, aber auch *Staphylococcus aureus* führen zu schweren Komplikationen im Verlauf einer Influenzainfektion. Bakterielle Proteasen bewirken zudem die proteolytische Spaltung des Vorläufer-Hämagglutinins in HA₁ und HA₂ und begünstigen damit die Absorption und Penetration weiterer Viren.

Bei Virusinfektionen ist die Rolle des IL-8 ohnehin ein Streitpunkt. Einige Autoren beschreiben eine Suppression der IL-8-Freisetzung durch Viren, so Panuska et al. (1995): eine gleichzeitige Infektion mit RSV bei LPS-stimulierten humanen Alveolarmakrophagen führt zur reduzierten IL-8-Freisetzung. Sprenger et al. (1996) wiesen die Suppression der IL-8-Freisetzung aus humanen Monozyten nach Infektion mit Influenza A Virus nach. Dagegen sprechen Arbeiten wie die von Choi et al. (1992) von einer IL-8-Induktion durch Virusinfektionen; hier wurde die IL-8-Genexpression nach Influenzainfektion in humanen Lungenepithelzellen gezeigt. Van Damme et al. (1989) hatte die Induktion von IL-8 durch Masernviren in humanen Fibroblasten untersucht.

Detmers et al. (1990) konnten beweisen, daß IL-8 die Bindungsaktivität des Leukozytenrezeptors CD11b/CD18 auf humanen Neutrophilen erhöht. IL-8 bewirkt eine Konformationsänderung von Leukozytenintegrinen wie LFA-1 (CD11a) und Mac-1 (CD11b) an rollenden Leukozyten, was eine gesteigerte Affinität dieser Moleküle zum Adhäsionsmolekül ICAM-1 bewirkt. Demzufolge können diese Leukozyten fester an das Endothel binden und eine Auswanderung ins Gewebe kann erfolgen. Da CD11b/CD18-Rezeptoren nicht nur auf neutrophilen Granulozyten, sondern auch auf Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen gefunden wird, ist eine IL-8-Wirkung auf die Attraktion dieser Zellen nicht auszuschließen.

Mittlerweile wird die anfangs umstrittene chemotaktische Wirkung von Interleukin-8 auf T-Lymphozyten (Subpopulationen) nicht mehr angezweifelt (Bacon et al., 1989; Leonard et al., 1990; Larsen et al., 1989; Wilkinson & Newman, 1992); zusätzlich konnte der IL-8-Rezeptor B auf T-Lymphozyten als verantwortlicher Vermittler dargestellt werden (Moser et al., 1993; Chuntharapai et al., 1994; Xu et al. 1995). Auch neuere Arbeiten stellen die Wirkung von IL-8 auf T-Zellen unter Beweis, so beispielsweise Pace et al. (1999), der IL-8 als wichtigen Faktor für die Rekrutierung von Lymphozyten *in vivo* beschreiben konnte, und Kim et al. (1998) zeigten den Einfluß auf Proliferation und Aktivierung von CD4(+) T-Zellen.

Darüberhinaus können auch Monozyten, NK-Zellen, Basophile und Eosinophile unter dem Einfluß von IL-8 stehen; hier ist wiederum der IL-8-Rezeptor B

verantwortlich (Sebok et al. 1993; Leonhard et al., 1990; Morohashi et al., 1995; Chuntharapai et al., 1994).

Diese hier zusammengestellten Fakten weisen IL-8 möglicherweise eine umfassendere Rolle in der Leukozytenchemotaxis und -aktivierung zu, als die zunächst beschriebene alleinige Wirkung auf neutrophile Granulozyten.

Interleukin-8 wurde im Rahmen dieser Arbeit in allen untersuchten Zelltypen (A549, U1752, NHBE) nach Infektion mit Influenzavirus A/PR8/34 nachgewiesen (Abb. 26, 27, 28). Während bei anderen Chemokinen wie RANTES, MIP-1 α , oder GRO- α in den primären Bronchialepithelzellen lediglich die Expression des betreffenden Gens nachgewiesen werden konnte (Abb. 36), zeigte sich in den Zelllinien A549 und U1752 eine Chemokinantwort, die auch auf Proteinebene zu finden war (GRO- α , MCP-1, RANTES); die Ergebnisse sind in den Abbildungen 29 bis 34 dargestellt. Der Chemokin-Proteinnachweis im ELISA gelang mit der Sensitivität der Testmethode nicht im Überstand der primären Bronchialepithelzellen. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den produktiven A549- und U1752-Zellen um immortalisierte Zellen handelt, die sich möglicherweise in einer Chemokinantwort anders als primäre Zellen eines lungengesunden Spenders verhalten. Vorstellbar wäre, daß primäre Zellen einen zusätzlichen Stimulus benötigen, um die Chemokintranskripte zu translatieren oder daß erst die Wirkung eines zweiten Stimulus die Freisetzung der Chemokine aus den Zellen bewirkt.

Für IL-8 liegt eine geringe konstitutive Expression des Gens vor (Abb. 35), so daß möglicherweise reife IL-8-mRNA bereits im Zytoplasma vorliegt und durch das Virus nicht blockiert werden kann (das wurde bereits beim MIF als möglicher Mechanismus diskutiert). Somit wäre die Translation und Freisetzung von IL-8 erklärbar und ebenso die Diskrepanz zu den anderen untersuchten Chemokinen.

Der vorliegende Befund, daß lediglich IL-8 im Überstand Influenza A-virusinfizierter primärer Lungenepithelzellen nachweisbar war, steht im Gegensatz zu den Aussagen von Matsukura et al. (1998), die das CC-Chemokin RANTES nach Influenza A-Virusinfektion im Überstand primärer Lungenepithelzellen fanden (500 pg/ml, 72h p.i.). Da bei dieser Arbeit Zellen

von Patienten mit Lungenkarzinomen eingesetzt wurden, ist nicht auszuschließen, daß diese Zellen nicht wie Zellen eines lungengesunden Spender reagierten, sondern ähnlich wie die in meiner Arbeit untersuchten immortalisierten Zellen (A549, alveolär und U1752, bronchiolär).

Ein weiterer Vertreter des CXC-Chemokine, das neutrophilenattrahierende GRO- α (Abb. 29+30), konnte nur in den Überständen A/PR/8/34-infizierter Zelllinien (A549 und U1752) nachgewiesen werden, und auch wieder nicht bei primären Bronchialepithelien. Die Letzteren zeigten zwar eine induzierte Expression der mRNA, waren aber offensichtlich nicht in der Lage, diese Transkripte in Proteine umzuschreiben und freizusetzen. Das mag einerseits an den Mechanismen des Virus liegen, neue Transkripte im Zellkern durch Cap-stealing auszuschalten, eine andere mögliche Erklärung wäre, daß diese Zellen einen weiteren Stimulus benötigen, der die Freisetzung triggert. Das würde natürlich voraussetzen, daß die Transkripte doch ins Zytoplasma gelangen, bevor die alleinige Proteinsynthese für das Virus allein einsetzt.

Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Zelllinien, die beide nach 12-24 h p.i. beginnen, GRO- α zu sezernieren; offensichtlich wird die Proteinsynthese zunächst nicht durch das Virus behindert, auch ließ sich die mRNA bereits 2 h p.i. nachweisen (Abb. 35).

Das gleiche Reaktionsmuster zeigte sich für das CC-Chemokin RANTES, welches vorzugsweise auf T-Zellen, Makrophagen und auch NK-Zellen wirkt.

Die primären Bronchialepithelzellen NHBE wiesen einen Unterschied zu den Zelllinien auf: hier wurde auch die mRNA für ein weiteres CC-Chemokin, MIP-1 α , nach 48 h p.i. (Abb. 36) induziert. Da diese Induktion so spät in der Infektion stattfindet, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Transkripte hierfür nicht mehr translatiert werden können.

Bei Entzündungsvorgängen im Körper, wie sie auch im respiratorischen Trakt unter einer Infektion mit Influenza A-Viren auftreten, gibt es eine Balance zwischen Gewebeerstörung durch das Virus und Gewebeheilung durch inflammatorische Vorgänge, aber möglicherweise spielen auch Gewebeerstörungen als Folge einer überschießenden, entzündlichen Abwehrreaktion eine Rolle. Wie bereits diskutiert, könnte MIF auch neben den

für den Organismus günstigen Einflüssen wie Makrophagen-Migrationshemmung und Makrophagen- und Neutrophilen-Aktivierung im Zusammenspiel mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 und TNF- α zu einer verstärkten Inflammation des ohnehin stark geschädigten Gewebes führen, insbesondere wenn antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 nicht in ausreichender lokaler Konzentration vorliegen und somit der Heilungsprozess ungünstig beeinflusst wird. Obwohl IL-10 von Makrophagen bei einer Infektion mit Influenza A-Viren freigesetzt wird (U. Halbach, Diplomarbeit 1996), ist eine insuffiziente Produktion vorstellbar.

4.3. Vorinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen: IL-1 β und TNF- α

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sind als Induktoren von CC- und CXC-Chemokinen bekannt (Baggiolini et al., 1994) und wurden deshalb hier im Zusammenhang mit der A/PR/8/34-Infektion untersucht.

4.3.1. Stimulation mit TNF- α

4.3.1.1. Einfluß auf Chemokine und MIF

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alveoläre und bronchioläre Zelllinien (A549 und U1752) mit TNF- α vorbehandelt und es konnte die erwartete Induktion bei IL-8, GRO- α , MCP-1 und RANTES im ELISA gezeigt werden (Abb. 37:A549; Abb. 38: U1752). Die nachfolgende Infektion mit A/PR/8/34 erbrachte, mit einer Ausnahme, keinen synergistischen Effekt. Allein bei RANTES induzierte die Infektion bei TNF- α -vorbehandelten Zellen eine höhere Freisetzung (Abb. 37d; Abb. 38d). Dies war bei den alveolären Zellen A549 besonders auffällig, fiel aber bei den bronchiolären Zellen U1752 nicht so deutlich aus. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß möglicherweise mehrere Stimuli notwendig sind, um eine effektive Freisetzung von Chemokinen zu erreichen.

Allerdings erwies sich TNF- α bei den untersuchten Zelllinien nicht als Induktor für eine Freisetzung von MIF; Calandra et al. (1994) hatte dies bei Makrophagen zeigen können. Diese Konstellation spricht wiederum für den Befund, daß MIF im Gegensatz zu Chemokinen aus Influenza-A-infizierten Zellen passiv (aber dennoch bioaktiv) freigesetzt wird.

4.3.1.2. Zeigt TNF- α antivirale Wirkung?

Eine antivirale Wirkung, die TNF- α zugesprochen wurde (Kohase et al., 1996; Mestan et al., 1986; Wong et al., 1996; Van Damme et al., 1987), konnte im hier eingesetzten Zellsystem mit 10 ng/ml rekombinantem TNF- α nicht beobachtet werden. Eventuell könnten niedrigere oder auch höhere Dosierungen einen Einfluß haben, was sich aber im Rahmen meiner Arbeit nicht als wichtige Aufgabe anbot.

4.3.2. Stimulation mit IL-1 β

4.3.2.1 Einfluß auf Chemokine und MIF

Die Sekretion von IL-8, GRO- α , MCP-1 und RANTES konnte nach IL-1 β -Vorinkubation, wie nach Baggiolini (1994) Ergebnissen erwartet, in beiden Zelllinien gezeigt werden; allerdings blieb die nachfolgende Infektion im wesentlichen ohne Einfluß (Abb. 43 bis 46). Wie TNF- α war auch IL-1 β nicht in der Lage, das konstitutiv exprimierte MIF aus den Zellen freizusetzen (Abb. 42a+b).

Die ebenso untersuchten normalen Bronchialzellen (NHBE) unterschieden sich in der Freisetzung von Chemokinen insofern von den oben genannten Zellen, als daß sie nur CXC-Chemokine, nämlich IL-8 und GRO- α , sezernierten, wenn sie mit 10 ng/ml IL-1 β vorbehandelt wurden, aber keines der CC-Chemokine MCP-1 und MIP-1 α . Hier wird auch wieder deutlich, daß sich primäre Zellen in der Reaktion auf verschiedene Stimuli deutlich anders als die immortalisierten Zellen einer Linie verhalten und die Ergebnisse aus genetisch veränderten

Zellen (Tumorzellen) nicht ohne weiteres auf gesunde Zellen oder gar auf das *in vivo*-Verhalten übertragen lassen.

4.3.2.2. Hat IL-1 β antivirale Wirkung?

Interferone und MxA-Protein

Die Vorinkubation mit IL-1 β erbrachte eine sehr deutliche Protektion bei A/PR/8/34-infizierten Zellen (Abb. 39+40). Das warf die Frage auf, durch welche Vorgänge dieser Schutz zustande kommt. Naheliegend war dabei eine Induktion von α/β -Interferonen, die von vielen humanen Zellen synthetisiert werden (Sen et al., 1993) und eine essentielle Rolle in der Virusabwehr spielen (Sen et al., 1993; Müller et al., 1994). Sowohl IFN- α als auch IFN- β konnten mit dem eingesetzten ELISA-Testsystem (Biosource) nicht nachgewiesen werden, wenn der Überstand der bronchiolären Zellen nach 4 bzw. 40 Stunden Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β untersucht wurde. Die Nachweisgrenzen wurden bei dem IFN- α -ELISA bei 15 pg/ml angegeben, beim IFN- β -ELISA mit 3 IU/ml. Ronni et al. (1997) konnte in A549-Zellen bis 16 h p.i. auch keine meßbaren Spiegel nachweisen (< 3 IU/ml), allerdings dann nach 24 Stunden eine, wenn auch niedrige Aktivität (7 IU/ml), die Autoren setzten dazu einen Bioassay (Hep2 Zellen und VSV) ein.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die mein Ergebnis erklären können. Zum einen kann die Konzentration des produzierten Interferons so niedrig sein, daß sie im ELISA nicht erfaßt wird, aber dennoch ausreichend ist, einen Schutz vor der Infektion mit A/PR/8/34 zu gewährleisten. Zum anderen wäre es vorstellbar, daß diese ohnehin geringe Menge IFN- α/β an die IFN-Rezeptoren gebunden wird, somit im Überstand nicht frei auftritt und im ELISA nicht erfaßt werden kann.

Zumindest konnte die IFN- β -mRNA nach Vorinkubation mit 10 ng/ml IL-1 β nachgewiesen werden, und es ist wahrscheinlich, daß diese Transkripte auch in Protein umgeschrieben werden. Das würde die Annahme unterstützen, daß IFN- β zwar in geringen Mengen freigesetzt und dann auch über den Rezeptor wirken kann, aber eben nicht im ELISA detektierbar ist.

Das Schlüsselmolekül in der IFN-vermittelten, antiviralen Wirkung sind die humanen MxA-Proteine. Diese Mx-Proteine gehören zu der Dynamin-Superfamilie der hochmolekularen GTPasen (Staeheli et al., 1993). MxA-Proteine werden exklusiv durch Typ I-Interferone induziert (Simon et al., 1991), sammeln sich im Zytoplasma der Zellen an (Staeheli et al., 1985; Aebi et al., 1989) und interferieren mit der Vermehrung und Ausbreitung verschiedener Orthomyxoviren (Pavlovic et al., 1992; Frese et al., 1995; Pavlovic et al., 1995) und mehreren anderen Viren, wie Rhabdo-, Paramyxo- und Bunyaviren (Pavlovic et al., 1990; Schnorr et al., 1993; Schneider-Schaulies, 1994; Zhao et al., 1996). Georg Kochs und Otto Haller konnten 1999 den folgenden Befund veröffentlichen: MxA blockiert den Transport des Nucleocapsids des Influenza-ähnlichen Thogoto-Virus in den Zellkern und verhindert auf diese Weise die Transkription des viralen Genoms. Die Autoren bieten zwei mögliche Erklärungen an; Multimere der MxA-Proteine könnten die viralen Nucleocapside umhüllen und damit Kernsignale verdecken oder MxA-Proteine könnten die Nucleocapside an Stellen im Zytoplasma bringen, wo diese immobilisiert und abgebaut werden. Die neueste Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe (Weber et al., 2000) beweist einen weiteren Wirkungsaspekt von MxA-Proteinen: nukleäres MxA hemmt direkt die virale Polymeraseaktivität.

Van Damme et al. berichtete in mehreren Arbeiten, daß IFN- β ein Mediator des antiviralen Effektes von IL-1 ist (1981, 1985, 1987). Zu dieser Zeit war das zum Maus-Protein Mx homologe humane Protein MxA noch nicht bekannt. Horisberger und Hochkeppel (1987) konnten dann das 78 kD-Protein aufreinigen und die Homologie zu Mx-Protein der Maus darstellen. Das Gen für MxA liegt auf dem Chromosom 21, zusammen mit dem Rezeptor für α/β -Interferon. Goetschy et al. (1989) stellten dar, daß sowohl TNF- α als auch IL-1 α und - β eine Aktivierung des MxA-Gens bewirken, und daß die antivirale Aktivität dieser proinflammatorischen Proteine durch Antikörper gegen IFN- β neutralisiert werden kann. Diese Arbeitsgruppe setzte humane embryonale Lungenzellen (HEL-Zelllinie) ein. Dem widersprach die Arbeitsgruppe um O. Haller und P. Staeheli (Simon et al., 1991); sie untersuchten die Wirkung von IL-1 α und TNF- α auf humanen Fibroblasten (Vorhaut, niedrige Passagen),

humanen PBMCs und im Mausmodell. Sie konnten weder mit IL-1 α noch mit TNF- α eine Mx-induzierende Aktivität nachweisen, haben aber keine befriedigende Erklärung für die Diskrepanz zu Goetschys Ergebnissen. Meine eigenen Daten zeigen, daß entweder sehr geringe Mengen (<3 IU/ml IFN- β) ausreichend sind, um eine Induktion von MxA-Proteinen auszulösen oder daß doch eine direkte Induktion durch IL- β in bestimmten Zellsystemen möglich ist. Goetschy et al. (1989) hatte gezeigt, daß MxA-mRNA 2 h nach Induktion durch IFN- β nachweisbar ist, Ronni et al. (1997) konnte in den ersten 16 Stunden nach Infektion von A549-Zellen mit Influenza A/Beijing/353/89 kein IFN- α/β nachweisen (< 3 IU/ml). Die von mir untersuchten Zellen (A549 und U1752) wiesen bereits 2 h nach IL-1 β -Behandlung MxA-Transkripte auf; in diesen 2 Stunden müßte dann also die Induktion von Interferon ablaufen, die Proteinsynthese und -freisetzung, die Bindung von IFN an den Rezeptor und anschließend die Geninduktion von MxA und dessen Synthese. Das erscheint eine imposant schnelle Kaskade von Ereignissen zu sein. Eine Verifizierung dieser schnellen Reaktion wäre nur mit einer engmaschigen Kinetik und blockierenden Antikörpern gegen IFN- α/β möglich und ist auch vorgesehen.

5. Zusammenfassung

Die Zellen des Respirationstraktes sind die Zielzellen einer Infektion mit Influenza A-Viren. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer massiven Gewebeerstörung und in der Folge zu einer Einwanderung von Leukozyten in das Entzündungsgebiet. Lungenepithelzellen sind selbst in der Lage, immunmodulatorische Moleküle freizusetzen und damit die Immunantwort zu beeinflussen. Zytokine wie der Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) und Chemokine spielen hierbei eine Schlüsselrolle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß virusinfizierte Zellen des Respirationstraktes durch nekrotische Vorgänge sterben. In zwei Zelllinien (bronchioläre Zellen U1752 und alveoläre Zellen A549) und in primären humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) konnte dieser Mechanismus eindeutig durch Mikroskopie, Annexin-V-Fluoreszein-Methode, DNA-Fragmentation und TUNEL-Technik belegt werden. Das Ergebnis fügt sich in das histopathologische Bild einer raschen Desquamation des Bronchialepithels bei einer Influenza-Erkrankung.

MIF, der Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor, ist ein Zytokin, welches überwiegend in proinflammatorischer und leukozytenaktivierender Weise an immunologischen Reaktionen beteiligt ist.

MIF wird in alveolären (A549) und bronchiolären (U1752, NHBE) Zellen konstitutiv exprimiert. Auch die mRNA für dieses Zytokin konnte in den genannten Zellen in konstitutiver Expression nachgewiesen werden.

Zwar konnte weder auf DNA- noch auf Proteinebene eine Regulation der Expression von MIF während einer Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8/34 nachgewiesen werden, aber es zeigte sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Infektion eine Freisetzung des Zytokins. Der eindeutige Nachweis der Bioaktivität dieses durch Nekrose freigesetzten Proteins konnte anhand eines Assays erbracht werden, der auf der MIF-spezifischen Calcium-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern basiert.

Neben seinem migrationshemmenden Einfluß auf Makrophagen wirkt MIF auf Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen aktivierend. Während einer

Influenza-Infektion aus Lungenepithelzellen freigesetztes MIF ist somit in der Lage, die für die Elimination der Viren verantwortlichen Zellen des Immunsystems zu beeinflussen und damit die Regeneration des Gewebes zu unterstützen. Allerdings wäre es auch denkbar, daß hohe MIF-Spiegel zu einer überschießenden Entzündungsreaktion beitragen. Diese Konstellation wurde für MIF beim akuten respiratorischen Syndrom (ARDS) beschrieben.

Neben MIF spielen die in Lungenepithelzellen induzierbaren Chemokine eine Rolle in der Anlockung und Aktivierung immunkompetenter Zellen im Verlauf einer Infektion mit Influenza A-Viren. Bei der Untersuchung konnte nur das CXC-Chemokin IL-8 als Protein bei allen Lungen-Zelltypen nachgewiesen werden. Die Zellen der Linien A549 und U1752 zeigten zusätzlich eine Sekretion von GRO- α und RANTES und die entsprechende Regulation der mRNA-Expression. Allerdings wurde bei den primären Bronchialepithelzellen (NHBE), die nur das IL-8-Protein sezernierten, auch eine Hochregulation der mRNA mehrerer Chemokine gefunden: RANTES, MIP-1 α und GRO- α . Möglicherweise benötigen primäre Zellen im Gegensatz zu Tumorzellen einen zweiten Stimulus, um die Translation der Chemokin-mRNA in den infizierten Zellen zu bewirken.

Eine Vorbehandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β bewirkte bei A/PR/8/34-infizierten Zellen einen Schutz vor Infektion und damit vor Zelltod. Als verantwortlicher Mechanismus konnte die Induktion von Mx-Proteinen gezeigt werden, welche sich hier ohne die benötigte, aber nicht nachweisbare IFN- α/β -Sekretion abspielte. Entweder sind geringste, im ELISA nicht nachweisbare Mengen an Interferon ausreichend, um die Induktion von Mx-Proteinen und damit den Schutz vor einer Infektion der Lungenepithelzellen mit Influenza A-Viren zu bewirken, oder aber es existiert ein direkter, noch nicht bekannter Weg der MxA-Induktion durch IL-1 β in den untersuchten Zellen.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, daß Lungenepithelzellen sehr suszeptibel auf Influenza A Virus reagieren, Zytokine wie MIF und Chemokine generieren und letztlich über Nekrose und nicht Apoptose sterben. Insbesondere die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen ist die Voraussetzung für Rekrutierung und Aktivierung von einwandernden Leukozyten zur effizienten antiviralen Immunabwehr.

6. Literaturangaben

Aebi, M., Fäh, J., Hurt, N., Samuel, C.E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., Staeheli, P., 1989. CDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol.Cell.Biol.*, 9: 5062.

Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R., 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell-activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 93: 7849-7854.

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R.C., Bucala, R. 1997. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol.* 150:235.

Bacher, M., Eickmann, M., Gemsa, D., Heiske, A.,. Eingereicht Jan 2000. Human cytomegalovirus induces MIF in fibroblasts.

Bacon, K.B., Westwick, J., Camp, R.D.R., 1989. Potent and specific inhibition of IL-8, IL-1 α and IL-1 β induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 165: 349.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines -CXC and CC chemokines. *Adv.Immunol.*, 55: 97-179.

Baldwin, S.R., Simon, R.H., Grum, C.M., Boxer, L.A., Devall, L.J., 1986. Oxidant activity in expired air of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*, Jan. 4; 1 (8471):11.

Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T., 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature*, 385: 640-644.

Becker, S., Reed, W., Henderson, F.W., Noah, T.L., 1997. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the beta-chemokine RANTES. *Am.J.Physiol.* Mar; 272 (3Pt 1): L512-20.

Bergh, J., Nilsson, K., Zech, L., Giovanella, B. (1985). Establishment and characterization of a continuous lung squamous carcinoma cell line (U 1752). *Anticancer Res.* 1: 317-322.

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A., and Bucala, R. 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature (London)* 365, 756-759.

Bernhagen, J. Calandra, T., Cerami, A., Bucala, R. 1994. Macrophage migration inhibitory factor is a neuroendocrine mediator of endotoxaemia. *Trends Microbiol.* 2: 198.

Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R. 1994. The emerging role of MIF in septic shock and infection. *Biotherapy* 8: 123.

Bloom, B.R., and B. Bennet. 1966. Mechanisms for reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science (Wash. DC)* 153: 80.

Bodkin, D.K., Knudson, D.L. 1985. Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA-RNA blot hybridization. *J. Virol. Methods*, 10: 45-52.

Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., David, J.R., 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J.Exp:Med.*, 189 (2): 341-346.

Bucala, R. 1994. MIF, a previously unrecognized pituitary hormone and macrophage cytokine, is a pivotal mediator in endotoxic shock. *Circ. Shock* 44: 35.

Bucala, R. 1994. Identification of MIF as a new pituitary hormone and macrophage cytokine and its role in endotoxic shock. *Immunol. Lett.* 43:23.

Butcher, E.C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1036.

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., and Bucala, R. 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J.Exp.Med.* 179: 1895.

Calandra, T. Bucala, R., 1995-96. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J.Inflamm.* 47:39.

Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R., 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68.

Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., Bucala, R., 1999. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.* 5: 181-191.

Choi, A.M.K., and D.B. Jacoby. 1992. Influenza virus A infection induces Interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett* 309, 327-329.

Christner, P., Fein, A., Goldberg, S., Lippmann, M., Abrams, W., Weinbaum, G., 1985. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.*, May; 131 (5): 690.

Chuntharapai, A., Lee, J., Hébert, C.A., Kim, K.J., 1994. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J.Immunol*, 153: 5682.

Churchill, W.H., Piessens, W.F., Sulis, C.A., David, J.R., 1975. Macrophage activates as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells. *J.Immunol.* 115: 781.

David, J. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 56: 72.

Detmers, P.A. Lo, S.K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., Cohn, Z.A., 1990. Neutrophil-activating protein 1/interleukin-8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J.Exp.Med.* 171:1155.

Donnelly, S., Haslett, C.C., Reid, P.T., Grant, I.S, Wallace, W.A., Metz, C.N., Bruce, L.J., Bucala, R. 1997. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute distress syndrome. *Nat.Med.* 3:320.

Dubitsky, A., Brown, J., Brown, J., Brandwein, H. 1992. Chemiluminiscent detection of DNA on nylon membranes. *Biotechniques*, 13: 392-400.

Fesq, H., Bacher,M., Nain, M., Gemsa, D., 1994. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. *Immunobiol.* 190: 175-182.

Fesus, L., Davies, P.J.A., Piacentini, M.,1991. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur.J.Cell.Biol.*, 56: 170-177.

Frese, M., Kochs, G., Meier-Dieter, U., Siebler, J., Haller, O., 1995. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J.Virol.*, Jun; 69 (6): 3904-3909.

Goldberg, D.A. 1980. Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc.Natl.Sci. USA*, 87, 9769-9773.

Gronenborn A.M., Clore, G.M., 1991. Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemoattractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. *Protein Eng.* 4, 263-269.

Guthrie, L., McPhail, L., Henson, P., Johnston, R., 1984. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.*, 160: 1656-1671.

Halbach, U., 1996. Freisetzung von Zytokinen aus Influenza A-infizierten Monozyten und Makrophagen: eine Balance zwischen TNF- α und IL-10. Diplomarbeit.

Harrison, A.M., Bonville, C.A., Rosenberg, H.F., Domachowske, J.B., 1999. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways. *Am.J.Respir.Crit.CareMed.* 159:1918-1924.

Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L., Goyert, S.M., 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD-14-deficient mice. *Immunity*, 4:407-414.

Hermanowski-Vosatka, A., Mundt, S.s., Ayala, J.M., Goyal, S., Hanlon, W.A., Czerwinski, R.M., Wright, S.D., Whitman C.P., 1999. Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry*, sep 28 (39):12841-9.

Hinshaw, V.A, Olsen, C.W., Dybdahl-Sissoko, N., Evans, D. 1994. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J.Virol.* 68; 6: 3667-3673.

Holtke, H.J., Sagner, G., Kessler, C., Schmitz, G. 1992. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its application. *Biotechniques*, 12: 104-113.

Hoogewerf, A., Leone, J., Reardon, I., Howe, J., Asa, D., Heinrichson, R., Ledbetter, S., 1995. CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes. *J.Biol.Chem.* 270, 3268-3277.

Horisberger, M.A., Hochkeppel, H.K., 1987. IFN- α induced human 78 kd protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effects of IFN- γ . *J.Interferon Res.*, 7 331-343.

Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., Beach, D.H., 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J.Exp. Med.*, 190 (10): 1375-1382.

Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T., Yoshie, O., 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX₃CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91: 521-530.

Imhof, B.A., Dunon, D. 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Adv.Immunol.*, 58: 345-416.

Jüttner, S., Bernhagen, J., Metz, C.N., Rölinghoff, M., Bucala, R., Gessner, A. 1998. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence of reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J.Immunol.* 161: 2383.

Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F., Morimoto, C., 1993. Direct association of adenosin-deaminase with T cell activation antigen, CD26. *Science*, 261, 466-469.

Kato, Y., Muto, T., Tomura, T., Tsumura, H., Watarai, H., Mikayama, T., Ishaka, K., Kuroki, R., 1996. The crystal structure of human glycosylation-inhibition factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3007-3010.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., 1994. Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266: 1395-1399.

Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, W., Gessner, A., Mischke, S., Jüttner, S., Brunner, H., Bernhagen, J., 1998. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J. Mol. Biol.* 280:85

Kim, J.J., Nottingham, L.K., Sin, J.I., Tsai, A., Morrison, L., Dang, K., Hu, Y., Kazahaya, K., Bennett, M., Dentchev, T., Wilson, D.M., Chalian, A.A., Boyer, J.D., Agadjanyan, M.G., Weiner, D.B., 1998. CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. *J. Clin. Invest.*, sep 15; 102 (6): 1112.

Kochs, G., Haller, O., 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2082-2086.

Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L.T., Vilcek, J., Seghal, P.B., 1986. Induction of β 2-interferon by tumor necrosis factor : a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*, 45: 659.

Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J., Matsushima, K., 1989. The neutrophil-activating protein NAP-1 is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243: 1464.

Lehrbach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, 1977. RNA molecular weight determinants by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 97-101.

Leonard, E.J., Skeel, A.S., Yoshimura, T., Noer, K., Kutvirt, S., Van Epps, D., 1990. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J.Immunol.* 144: 1323.

Lieber, M., Smith,B., Szakal,A.,Nelson-Rees, W., Todaro, G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J.Cancer.*17:62-70.

Matsakura, S., Kokubu, F., Noda, H., Tokunaga, H., Adachi, M., 1996. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchiolar epithelial cells, NCI-H292, induced by Influenza virus A. *J.AllergyClin.Immunol.* 98, 1080-1087.

Matsakura, S., Kokubu, F, Kubo, H., Tomita, T., Tokunaga, H., Kadokura, M., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y, Ohno, T., Suzaki, H., Adachi, M. 1998. Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after Influenza Virus A infection. *Am.J. Respir.Cell.Mol.Biol.*, 18, 255-264.

Mc Ginnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308: 428-433.

Mestan, J., Digel, W., Mitnacht, S., Hillen, H., Blohm, D., Möller, A., Jacobsen, H., Kirchner, H., 1986. Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro. *Nature*, 328: 816.

Miller, E.J. Cohen, A.B., Nagao, S., Griffith, D., Maunder, R.J., Martin, T.R., Weiner-Kronish, J.P., Sticherling, M., Christophers, E., Mattay, M.A., 1992. Elevated levels of NAP-1/ Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 146: 427-432,

Minor, T.E., Dick, E.C., Baker, J.W., Quelette, J.J., Cohen, M., Reed, C.E.. 1976. Rhinovirus and influenza type A infections as precipitants of asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 120: 149.

Mitchell, R.A., Metz, C.N. Pengs, T., Bucala, R. 1999. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J.Biol.Chem.*, Jun 18; 274 (25): 18100-18106.

Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., Kimura, Y. 1995. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J.Gen.Virol.* 76: 2869-2873.

Morohashi, H., Miyawaki, T., Nomura, H., Kuno, K., Murakami, S., Matsushima, K., Mukaida, N., 1995. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. *J.Leukoc.Biol*, Jan; 57 (1): 180.

Moser, B., Barella, L., Mattei, S., Schumacher, C., Boulay, F., Colombo, M.P., Baggiolini, M., 1993. Expression of transcripts for two interleukin-8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanom cells. *Biochem.J.*, Aug. 15; 294 (pt1): 285.

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, F.L., Hemmi, S., Pavlovic, R.M., Zinkernagel, R.M., Aguet, M., 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918.

Nain, M., Hinder, F., Gong, J.H., Schmidt, A., Bender, A., Sprenger, H., Gemsa, D., 1990. Tumor necrosis factor-alpha production of influenza A virus-infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *J.Immunol.*, 145: 1921-1928.

Nathan, C.F. Karnovsky, M.L., David, J.R., 1971. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J.Exp.Med.* 133:1356.

Nathan, C.F., Remold, H.G., David, J.R., 1973. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage function. *J.Exp.Med.* 137: 275.

Nishihira J., Koyama, Y., Mizue, Y, 1998. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. *Cytokine*, Vol 10, No3 (March): 199-205.

Nishino, T., Bernhagen, J., Shiiki, H., Calandra, T., Dohi, K., and Bucala, R. 1995. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol.Med.* 1:781

Noah, T.L., Becker, S.,1993. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by a human bronchial epithelial cell line. *Am. J. Physiol.*, Nov; 265 (5 Pt 1): L 472-8.

Pace, E., Gjomarkaj, M., Melis, M., Profita, M., Spatafora, M., Vignola, A.M., Bonsignore, G., Mody, C.H., 1999. Interleukin-8 induces lymphocyte chemotaxis into pleural space. Role of pleural macrophages. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*; may; 159 (5Pt1):1592.

Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., Gearing, D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*, 387: 611-617.

Panuska, J.R., Morolla, R., Rebert, N.A., Hoffmann, S.P., Tsivitse, P., Cirino, N.M., Silverman, R.H., Rankin, J.A., 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages.

Pauligk, C., 1997. Induktion von Zytokinen und Chemokinen in neutrophilen Granulozyten durch bakterielles Lipopolysaccharid und Influenza A-Virus. Diplomarbeit.

Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O., Staeheli, P. 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. J.Virol., 67: 470.

Pavlovic, J., Haller, O., Staeheli, P., 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. J.Virol., Apr.; 66 (4): 2564-2569.

Pavlovic, J., Arzet, H.A., Hefti, H.P., Frese, M., Rost, D., Ernst, B., Kolb, E., Staeheli, P., Haller, O., 1995. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. J.Virol, Jul.; 69 (7): 4506-4510.

Rampart, M., Herman, A.G., Grillet, B., Opdenakker, G., van Damme, J., 1992. Development and application of a radioimmunoassay for interleukin-8: detection of interleukin-8 in synovial fluids from patients with inflammatory joint disease. Lab.Invest. 66: 512-518.

Ronni, T., Matikainen, S., Sareneva, T., Melén, K., Pirhonen J., Keskinen, P., Julkunen, I., 1997. Regulation of IFN- α/β , MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. J.Immunol., 158: 2363-2374.

Rosengreen, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobson, L., Odh, G., Metz, C.N., Rorsman, H, 1996. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. Mol.Med. 2:143.

Schall, T.J., Jonstra, J., Dyer, B.J. Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M, Krensky, A.M. 1988. A human T-cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J.Immunol.*, 141, 1018-1025.

Schall, T.J., Bacon, 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr.Opin.Immunol.*, 6: 865-873.

Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Schuster, A., Bayer, M., Pavlovic, J., ter Meulen, V., 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J.Virol.*, Nov., 68 (11): 6910-6917.

Schnorr, I.-J., Schneider-Schaulies, S., Simon-Jödicke, A., Pavlovic, J., Horisberger, M.A., ter Meulen, V., 1993. MxA dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line.

Schröder, J.M., 1992. Generation of NAP-1 and related peptides in psoriasis and other inflammatory skin diseases. *Cytokines*, 4 54-76.

Schroth, M.K., Grimm, E., Frindt, P., Galagan, D.M., Konno, S., Love, R., Gern, J.E., 1999). Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*, 20, 1220-1228.

Sebok, K., Woodside, D., Al-Aoukaty, A., Anthony, D.H., Gluck, S., Maghazach, A.A., 1993. IL-8 induces the locomotion of human IL-2-activated NK cells. *J.Immunol.* 150: 1524.

Seed, B., 1992. Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazoniumsubstituted supports. In: *Genetic engineering: Principles and methods*. Vol 4. Setlow, J.K. & Hollaender, A (editors). Plenum Publishing New York, Page 91.

Sen, G.C., Ransohoff, R.M., 1993. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv.Virus Res.*, 42: 57.

Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., Cerami, A., 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 89, 3511-3515.

Sprenger, H., Meyer, R.G., Kaufmann, A., Bussfeld, D., Rischkowsky, E., Gerns, D., 1996). Selective induction of monocyte and neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. *J.Exp.Med.*, Sep. 1; 184(3): 1191-1196.

Staeheli, P., Dreiding, P., Haller, O., Lindemann, J., 1985. Polyclonal and monoclonal antibodies to the interferon-inducible protein Mx of influenza virus-resistant mice. *J.Biol.Chem*, Feb. 10; 260 (3): 1821.

Staeheli, P., Pitossi, F., Pavlovic, (1993) Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell.Biol*, 3: 268-272.

Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Klenk, H.-D., Garten W., 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *J.Gen.Virol*, 11: 2407-2414.

Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E. 1996. Crystal structure at 2.6 Angstrom resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 93, 5191-5196.

Suter, P.M., Suter, S., Girardin E., Roux-Lombard, P., Grau, G.E., Dayer, J.M. 1992. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock or sepsis. *Am.Rev.Respir.Dis*, May; 145 (5): 1016-1022.

Swope, M., Sun, H.W., Blake, P.R., Lolis, E. 1998. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *The EMBO Journal* Vol. 17. No 13, 3534-3541.

Takizawa, T., Matsukawa, S., Higuchi, Y., Nakamura, S., Nakanishi, Y., Fukada, R. 1993. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J.Gen:Virol.* 74: 2347-2355.

Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta [see comments]. *Nature*, 361: 79-82.

Thomas, P.S. 1980. Hybridisation of denatured RNA and small DNA-Fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 77, 5201-5205.

Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F., Garvin, D.F. 1992. Increasing the efficiency and economy of the chemiluminescent detection of DNA. *Biotechniques*, 13: 339-340.

Van Damme, J., Decock, B., Lenaerts, J.P., Conings, R., Bertini, R., Mantovani, A., Biliau, A., 1989. Identification by sequence analysis of chemotactic factors for monocytes produced by normal and transformed cells stimulated with virus, double-stranded RNA or cytokine. *Eur.J.Immunol.*, Dec; 19 (12): 2367-2373.

Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 1998. Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans?. *J.Infect.Dis* 177 (4), 1076-1079.

Vu, T., Wheaton, V., Hung, D., Charo, I., Coughlin, S., 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, 353, 674-677.

Waeber, G., Thompson, N., Chautard, T., Steinmann, M., Nicod, P., Pralong, F.P., Calandra, T., Gaillard, R.C., 1998. Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Molecular Endocrinology*, May, 12 (5): 698-705.

Wahl, G.M., Berger, S.L., Kimmel, A.R. 1987. Molecular hybridisation of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol*, 152: 399-407.

Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., Baggolini, M. 1987. Purification and amino sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem.Biophys. Res.Commun*, 149, 755-761.

Warshawski, F.J., Sibbald, W.J., Driedger, A.A. Cheung, H., 1986. Abnormal neutrophil-pulmonary interaction in the adult respiratory distress syndrome. Qualitative and quantitative assessment of pulmonary neutrophil kinetics in humans with in vivo ¹¹¹Indium neutrophil scintigraphy. *Am.Rev.Respir.Dis.*, May; 133 (5): 797-804.

Waterson, A.P. 1962. Two kinds of myxoviruses. *Nature* 193: 1163-1164.

Weber, F., Haller, O., Kochs,G., 2000. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleinprotein complexes. *J.Virol.*, Jan.; 74 (1): 560.

Weiser, W.Y., Temple, P.A., Witek-Gianotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., David, J.R., 1989. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; 86: 7522.

Weiser, W.Y., Pozzi, L.M., David, J.R., 1991. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J.Immunol.*, 147: 2006-2011.

Welsh, J.J., Dietlein, L.F., Low, F.N., Burch, G.E., Mogabgab. 1960. Bronchotracheal response in human influenza. *Arch.Intern. Med.* 108:376.

Wennemuth, G., Aumüller, G., Bacher, M., Meinhardt, A., 2000. Macrophage Migration Inhibitory Factor induced Ca^{2+} response in rat testicular peritubular cells. *Biol.Reprod.* Jun; 62 (6): 1632-1639.

Wilkinson, P.C., Newman, I., 1992. Identification of IL-8 as a locomotor attractant for activated human lymphocytes in mononuclear cell cultures with anti-CD3 or purified protein derivative of mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.*; Vol. 149: 2689.

Wong, G.H.W., Goeddel, D.V., 1986. Tumor necrosis factor α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature*, 324: 73.

Xu, L., Kelvin, D.J., Ye, G.Q., Taub, D.D., Ben-Baruch, A., Oppenheim, J.J., Wang, J.M., 1995. Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8. *J.Leukoc.Biol.*, Feb; 57 (2):335.

Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschumacher, R.E., Lyttle, C.R., 1992. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J.Biol.Chem.*, 267, 11968-11971.

Yoshie, O., Imai, T., Nomiya, H., 1997. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J.Leukoc.Biol.*, 62: 634-644.

Zhao, H., De, B.P., Das, T., Banerjee, A.K., 1996. Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology*, Jun. 15; 220 (2): 330-338.

Danksagung

Professor Dr. Diethard Gerns gilt mein erster und besonderer Dank; er ermöglichte mir diese Arbeit im Rahmen DFG-geförderter Projekte (GE 354/ 8-3; GE 354/ 12-1). Sein Interesse an der vorliegenden Arbeit, sein Rat und seine stete Streitbarkeit, auch in anderen wichtigen Fragen, waren mir Hilfe und Vergnügen.

Nicht minder herzlich möchte ich mich bei Dr. Michael Bacher bedanken, der mich aufs Beste fachlich betreute, der sich an Erfolgen freute und Mißerfolgen die Spitze nahm. Ihm und "seinem" MIF sei Dank für die Kehrtwende meiner Promotion. Nebenbei gab der eine oder andere „Bacher-Lacher“ dem Institutsleben eine nicht zu unterschätzende Würze im menschenlichen Miteinander.

Dr. Gunter Wennemuth stellte Wissen, Geräte und sich selbst zur Verfügung, um mir die Messungen der Calcium-Fluxe zu ermöglichen. Diese waren ein höchst wichtiger Aspekt meiner Arbeit und ich bedanke mich sehr für seine Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Peter Barth für das Überlassen der humanen Lungenpräparate und seiner Mitarbeiterin Sabine Koch für das Erstellen der immunhistochemischen MIF-Darstellung im Bronchialepithel.

Dank gilt auch allen anderen Mitarbeiter des Institutes für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die die Tücken des Laboralltages erträglich machte. Der verbale Schlagabtausch mit Euch war herzerfrischend und bereichernd.

Einen besonderen Gruß möchte ich nach Stuttgart schicken, wo die andere Hälfte des „Duo infernale“, Dr. Marion Jacob, jetzt die Nase ins Riechepithel steckt. Mit ihr, Dr. Marianne Nain und Claudia Pauligk kamen auch andere „Kulturen“ als die Immunologie nicht zu kurz.

Mein innigstes Dankeschön allerdings geht an meinen Mann Michael, der auf zauberhafte Weise die Musik zurückbrachte und der besonders in den letzten Monaten mit viel Gelassenheit und Fürsorge eine verlässliche Basis für meine Arbeit schuf.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Freisetzung von Makrophagen-Migrationsinhibitions-Faktor (MIF) und Chemokinen aus Influenza A-Virus-infizierten Lungenepithelzellen“ im Institut für Immunologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Gemsa und Unterstützung durch Herrn Dr. M. Bacher ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation eingereicht.

Marburg, den 21.02.2000

Ute Arndt

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Halbach, U., Gerns, D., Bacher, M. (1998). Virus-dependent release of migration inhibitory factor (MIF) in lung epithelial cells. XIV. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Frankfurt. Abstract.

Halbach, U., Wennemuth, G., Gerns, D., Bacher, M. (1998). Sequential release of chemokines and migration inhibitory factor (MIF) in influenza A virus-infected lung epithelial cells. Immunobiology, Vol.199, Sept. 98. XIX. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Freiburg. Abstract.

Halbach, U., Gerns, D., Bacher, M. (1999). Release of migration inhibitory factor (MIF) and chemokines from influenza A virus-infected normal human bronchiolar epithelial cells. Immunobiology, Vol 200, Sept 99. XXX. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover. Abstract.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren
Universitätsprofessoren und Dozenten:

Aumüller, Barth, Beato, Bestgen, Elsässer, Fischer, Frenking, Fruhstorfer, Fuhs,
Garten, Gemsa, Golenhofen, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Herrler, Ihm,
Juncas, Kaffarnik, Kern, Kirchner, Klenk, Koch, Koolmann, Lang, Lauer, Lohöfer,
M. Löffler, H. Löffler, Lührmann, R. Müller, U. Müller, Niessing, Petzold, Reufel,
Rogausch, Röhm, Schachtschnabel, Schindler, Schwarz, Seifart, Seitz, Slenczka,
Suske, Unsicker, Voigt, von Löw, Waßmuth, Wesemann, Westermann, Westphal,
Wiegand.